

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA MÉDICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Streptococcus mutans*  
EM ISOLADOS INTRAFAMILIARES , POR MEIO DE MARCADORES RAPD**

**CURITIBA  
2006**

**MÔNICA MOREIRA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Streptococcus mutans*  
EM ISOLADOS INTRAFAMILIARES , POR MEIO DE MARCADORES RAPD**

Dissertação apresentada, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Setor de Ciências Biológicas na Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Aparecida Vicente.  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Chirlei Glienke de Blanco.

**CURITIBA**

**2006**

Universidade Federal do Paraná

**Sistema de Bibliotecas**

Moreira, Mônica

Variabilidade genética de *Streptococcus mutans* em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD. / Mônica Moreira. – Curitiba, 2006.

xiii; 108f. : il. ; 30cm.

Orientador: Vânia Aparecida Vicente

**Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica).**

1. Estreptococo 2. Carie dentaria I. Título II. Vicente, Vânia Aparecida III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica)

*Dedico esta obra aos meus amados filhos: Mariane, Marília e Fernando, a quem espero poder sempre orientar. Aos meus pais, meus eternos orientadores.*

*Ao meu esposo Roberto, pela compreensão e incentivo.*

*A todos que acreditam, superaram suas limitações e com determinação realizam os seus sonhos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me iluminar neste grande desafio e em especial...

Ao incentivo constante e incansável apoio de minha amiga e orientadora Prof<sup>a</sup> Vânia Aparecida Vicente. Suas sugestões e ensinamentos foram indispensáveis no meu aperfeiçoamento e para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Prof<sup>a</sup> Vanete Soccol, Coordenadora, pela dedicação ao programa de pós-graduação.

À Prof<sup>a</sup> Chirlei Glienke de Blanco, pela co-orientação e auxílio nas análises de variabilidade genética.

Ao Prof. Walter Boerger e equipe, pela acolhida no Laboratório de Ecologia Molecular e empréstimo de equipamentos.

À Prof<sup>a</sup> Eledi Alice C. F. Maia do Departamento de Genética, pela disponibilização dos equipamentos do Laboratório de Polimorfismos e Ligação.

Aos colegas dos Departamentos de Patologia Básica, Bioquímica, Zoologia e Genética; que muito contribuíram com este trabalho.

Aos pesquisadores da EMBRAPA, Osmir José Lavoranti e Guilherme de Castro Andrade, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos colegas da Secretaria Municipal de Saúde, em especial da Unidade de Saúde Augusta, pelo apoio.

Aos pacientes da Unidade de Saúde Augusta que gentilmente disponibilizaram-se a fazer parte desta pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1     INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2     OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
<b>3     REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
3.1   CÁRIE DENTAL .....	5
3.2 <i>Streptococcus mutans</i> .....	6
3.2.1 Caracterização Biológica .....	7
3.2.2 Identificação .....	9
3.2.3 Fatores de Virulência.....	10
3.2.4 Colonização por <i>Streptococcus mutans</i> .....	13
3.2.5 Transmissibilidade de <i>S. mutans</i> .....	15
3.3   MARCADORES MOLECULARES .....	19
3.3.1 Marcadores RAPD.....	21
<b>4     MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1   MATERIAL BIOLÓGICO.....	24
4.2   ESTERILIZAÇÃO .....	24
4.3   MEIOS DE CULTURA .....	24

4.3.1	Ágar Mitis Salivarius Sacarosado com Bacitracina e Telurito de Potássio (MSBS) .....	24
4.3.2	Ágar Sangue.....	25
4.3.3	Caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração).....	25
4.3.4	Meio Todd – Hewitt.....	25
4.4	SOLUÇÕES REAGENTES.....	25
4.4.1	Solução Salina.....	25
4.4.2	Água Peptonada.....	25
4.4.3	DNA polimerase.....	26
4.4.4	dNTP .....	26
4.4.5	EDTA 0,5M.....	26
4.4.6	Gel de Agarose (0,8%) .....	26
4.4.7	Gel de Agarose (1,4%) .....	26
4.4.8	Oligonucleotídeos Iniciadores ( <i>Primers</i> ).....	26
4.4.9	Tampão da amostra.....	27
4.4.10	Tampão CTAB.....	27
4.4.11	Tampão de corrida para gel de agarose ( TEB 10X) – pH 8,0 .....	27
4.4.12	Tampão tris-EDTA (TE).....	27
4.4.13	Solução de Brometo de Etídio .....	27
4.5	ESTOQUE .....	28
4.6	CASUÍSTICA .....	28
4.6.1	Anamnese .....	28
4.6.2	Exame Clínico.....	30
4.7	COLETAS SALIVARES .....	32

4.8	ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ESTIMATIVA DE <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> NA SALIVA. ....	32
4.8.1	Provas Bioquímicas para Identificação de <i>S. mutans</i> .....	33
4.8.1.1	Prova da Catalase .....	33
4.8.1.2	Prova da fermentação do Sorbitol e Manitol.....	34
4.8.1.3	Prova da Hidrólise da Esculina .....	34
4.8.1.4	Prova da Hidrólise da Arginina .....	34
4.9	EXTRAÇÃO DE DNA .....	34
4.10	VARIABILIDADE GENÉTICA .....	35
4.10.1	Amplificação do DNA por RAPD.....	35
4.10.2	Eletroforese .....	36
4.10.3	Análise da Variabilidade Genética.....	36
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39
5.1	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE <i>S. mutans</i> .....	39
5.1.1	Estimativa das UFC/mL de saliva cultivada.....	42
5.5	ANÁLISE DA ESTATÍSTICA MULTIVARIADA .....	45
5.6	ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA .....	51
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	71
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	72
	<b>ANEXOS</b> .....	81



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MACRO E MICRO MORFOLOGIA DE <i>Streptococcus mutans</i> .....	7
FIGURA 2 - DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE UFC/mL DE SALIVA, OBSERVADO EM ÁGAR MITIS SALIVARIUS .....	42
FIGURA 3 - BILOT DOS COMPONENTES PRINCIPAIS 1 E 2 .....	49
FIGURA 4 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD OBTIDO DE <i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> e <i>S. pyogenes</i> UTILIZANDO O PRIMER OPA 9.....	53
FIGURA 5 - DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA OBTIDA POR MARCADORES RAPD DAS LINHAGENS DESCRITAS NA TABELA 13, UTILIZANDO-SE O COEFICIENTE DE JACCARD E MÉTODO DE AGRUPAMENTO UPGMA.....	54
FIGURA 6 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS REPRESENTANDO O POLIMORFISMO GENÉTICO ENTRE OS ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> .....	55
FIGURA 7 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA <b>FAMÍLIA 1</b> , COMPOSTA POR MÃE E FILHO, LINHAGEM REFERÊNCIA DE <i>S. mutans</i> E ISOLADOS DE <i>S. pyogenes</i> .....	57
FIGURA 8 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA <b>FAMÍLIA 8</b> , COMPOSTA POR MÃE E TRÊS FILHOS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE <i>S. mutans</i> E ISOLADOS DE <i>S. pyogenes</i> .....	59
FIGURA 9 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA <b>FAMÍLIA 2</b> , COMPOSTA POR MÃE, PAI E TRÊS FILHOS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE <i>S. mutans</i> E ISOLADOS DE <i>S. pyogenes</i> .....	60
FIGURA 10 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA <b>FAMÍLIA 3</b> , COMPOSTA POR MÃE, PAI E UM FILHO, LINHAGEM REFERÊNCIA DE <i>S. mutans</i> E ISOLADOS DE <i>S. pyogenes</i> .....	61
FIGURA 11 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA <b>FAMÍLIA 5</b> , COMPOSTA POR MÃE, PAI E TRÊS FILHOS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE <i>S. mutans</i> E ISOLADOS DE <i>S. pyogenes</i> .....	62

- FIGURA 12 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA **FAMÍLIA 7**, COMPOSTA POR MÃE, PAI E DOIS FILHOS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes*..... 63
- FIGURA 13 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA **FAMÍLIA 6**, COMPOSTA POR MÃE, PAI E CINCO FILHOS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes*..... 64
- FIGURA 14 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA **FAMÍLIA 4**, COMPOSTA POR MÃE, PAI E TRÊS FILHOS E UMA NETA, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes* ..... 66
- FIGURA 15 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA **FAMÍLIA 9**, COMPOSTA POR MÃE E TRÊS FILHOS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes*..... 67
- FIGURA 16 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. sobrinus* DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DAS FAMÍLIAS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes* ..... 69

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DAS ESPÉCIES DE ESTREPTOCOCOS DO “GRUPO MUTANS”, OS SOROTIPOS E A PRINCIPAL FONTE DE ISOLAMENTO.....	8
TABELA 2 - CONDIÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA DAS FAMÍLIAS ESTUDADAS.....	29
TABELA 3 - LEVANTAMENTO INTRAFAMILIAR DO CONSUMO DE SACAROSE E FREQUÊNCIA DE HIGIENE BUCAL .....	30
TABELA 4- CASUÍSTICA OBSERVADA NAS NOVE FAMÍLIAS, 40 INDIVÍDUOS AVALIADOS.....	31
TABELA 5 - NÚMERO E PERÍODO DE COLETAS DE AMOSTRAS SALIVARES EM DOMICÍLIO.....	32
TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DAS ESPÉCIES DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS, BASEADO EM PROVAS BIOQUÍMICAS E DE SENSIBILIDADE À BACITRACINA .....	33
TABELA 7 - SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTIDEOS INICIADORES .....	36
TABELA 8 - PADRÃO DE ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS SALIVARES SEGUNDO O CRITÉRIO DE LEITURA ADOTADO .....	40
TABELA 9 - AGRUPAMENTO DE INDIVÍDUOS SEGUNDO A FAMÍLIA DE ORIGEM. VERIFICADO DE ACORDO COM O PADRÃO DE ISOLAMENTO NAS AMOSTRAS SALIVARES .....	42
TABELA 10 - ISOLADOS INTRAFAMILIAR DE <i>S. mutans</i> E <i>S. sobrinus</i> , IDENTIFICADOS SEGUNDO MACRO MORFOLOGIA DE COLÔNIA, E BIOQUIMISMO .....	43
TABELA 11 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E COMUNALIDADE DAS VARIÁVEIS.....	47
TABELA 12 - MATRIZ DOS FATORES ROTACIONADOS .....	48
TABELA 13 - LINHAGENS UTILIZADAS NO ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>S. mutans</i> , POR MARCADORES RAPD.....	51
TABELA 14 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE MARCADORES MOLECULARES .....	56
TABELA 15 - AMOVA. VARIÂNCIA OBSERVADA DENTRO E ENTRE AS QUATRO POPULAÇÕES OBTIDAS COM MARCADORES RAPD.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

μL: Microlitro

AMSB: Ágar Mitis Salivarius Sacarosado com Bacitracina e Telurito de Potássio

AP-PCR: *Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction*

ATCC: *American Type Culture Collection*

Atm: Atmosfera

BHI : Infusão de Cérebro e Coração

ceo-d: Contagem de dentes decíduos cariados, extraídos por cárie ou obturados

CIA: Clorofórmio-álcool isoamílico

CPO-D: Contagem de dentes permanentes cariados, perdidos por cárie ou obturados.

CTAB: Brometo de cetiltrimetilamônio (*Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*)

*dexA*: Gene dextranase

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético (*Ethylenediaminetetracetate*)

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FOUSP: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

*fff*: Gene frutossiltransferase

GI: Glicanos insolúveis

*gtfB*: Gene β-glicosiltransferase

kb: Quilo base

LACEN: Laboratório Central do Estado do Paraná

MEE: Eletroforese de isoenzimas

Min: minutos

mM: milimolar

N: Normal

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NTSYS: *Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*

ORFS: *Predicted Protein-Encoding Open Reading Frames*

pb: Pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PEC: Polissacarídeos extra-celulares

pH: Potencial hidrogeniônico

PSF: Programa de Saúde da Família

RAPD: Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

REA: Análise de enzima de restrição

RFLP: Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

rpm: Rotações por minuto

TE: TRIS-EDTA

TEB: TRIS-EDTA-ácido bórico

TRIS: Tris-(hidroximetil)-aminometano

UFC/mL: Unidade formadora de colônia/ mililitro

UPGMA: *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*

UV: Radiação ultravioleta

WHO: World Health Organization

## RESUMO

Vários estudos confirmam que o *Streptococcus mutans* é o principal agente etiológico, da doença cárie em populações humanas e que existe uma correlação significativa e positiva, entre o número de lesões cariosas e a concentração deste na saliva. Outros fatores como suscetibilidade do hospedeiro, dieta rica em sacarose, higiene bucal deficiente e tempo prolongado de exposição à bactéria; além das condições sócio-econômicas, culturais e ambientais de uma população, também podem interferir na progressão e severidade da doença. O *S. mutans* é amplamente distribuído na população, independente da ocorrência da cárie. Variações de virulência dos diferentes sorotipos podem explicar a diversidade de quadros clínicos da doença. A detecção de isolados com alta similaridade genética em indivíduos diferentes, sugere a existência de transmissibilidade. Neste contexto, nove famílias, totalizando 40 indivíduos, de baixo poder aquisitivo e com condições sociais homogêneas foram avaliadas, visando identificar os biosorotipos de *S. mutans*, por meio de bioquimismo e marcadores RAPD, e estabelecer o grau de similaridade entre os isolados intrafamiliar. Os indivíduos foram avaliados quanto à presença de lesões cariosas, histórico da doença, dieta, higiene bucal, perfil sócio-econômico de cada família e análise microbiológica da saliva. Análise estatística multivariada foi realizada, e os isolados de amostras salivares foram caracterizados por meio de marcadores morfológicos, bioquímicos e RAPD. A extração do DNA total foi realizada através de maceração com CTAB e ultra-som associado. Para o RAPD foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores OPA 2, OPA 5, OPA 7, OPA 9 e OPA 13, e as bandas foram analisadas com o coeficiente de Jaccard e o método “UPGMA” foi utilizado para a construção dos dendrogramas. A consistência dos agrupamentos foi verificada por *Bootstrap* e as variações ocorridas foram esclarecidas pela análise de variância de marcadores moleculares (AMOVA). A análise multifatorial revelou que a cárie ativa estava fortemente associada ao alto consumo de sacarose e presença três isolados de *S. mutans* por indivíduo. Os fatores mãe e filho, idade, número de dentes atingidos pela doença, escolaridade dos pais, presença de cárie ativa e alto consumo de sacarose, foram os mais importantes para avaliação epidemiológica da doença nas famílias de baixa renda. Variabilidade genética entre isolados intrafamiliares e interfamiliares foi verificada, sendo que a distribuição intrafamiliar destes foi diferente em cada família. Em determinados indivíduos podem ter ocorrido infecções múltiplas, dados estes suportados pela grande variabilidade dos isolados, encontrada por meio dos marcadores RAPD. A existência de quatro isolados procedentes de indivíduos de uma mesma família apresentando 100% de similaridade, sugeriu a transmissão intrafamiliar destes.

**Palavras-Chave:** *Streptococcus mutans*, cárie dentária, RAPD.

## ABSTRACT

Several studies have confirmed that *Streptococcus mutans* is the main etiological agent of caries in human population, and that there is significative and positive correlation between the number of carious lesions and its concentration in the saliva. Other factors such as host susceptibility, a saccharose-rich diet, poor mouth hygiene, as well as the environmental, cultural, and socio-economic conditions of a population, also can interfere in the progression and severity of this disease. *S. mutans* is widely distributed in the population, regardless of the occurrence of caries. Variation in the virulence of different sorotypes can explain the diversity in the clinical manifestations of the disease. The detection of isolates with high genetic similarity in different individuals suggests the existence of transmissibility. In this context, nine low-income families of similar social conditions were assessed (totaling 40 individuals), to identify the sorotypes of *S. mutans* using biochemical tools and RAPD markers and to establish the degree of similarity between the intrafamilial isolates. Individuals were evaluated with respect to the presence of carious lesions, the history of the disease, the diet, the mouth hygiene, and the socio-economic profile of each family, as well as the microbiological analysis of the saliva. Multivariate statistical analyses were carried out, and the isolates from salivary samples were characterized using morphological, biochemical, and RAPD markers. Total DNA extraction was carried out through maceration with CTAB buffer and associated sonication, and RAPD reactions used the OPA 2, OPA 5, OPA 7, OPA 9, and OPA 13 oligonucleotide primers. The software “NTSYS” was used for polymorphism analysis using the Jaccard coefficient and the “UPGMA” method was used for the construction of dendrograms. The consistency of different groupings was evaluated by bootstrap using the “Winboot” software, and observed variations were investigated by molecular analysis of variance (AMOVA). The result of the multifactorial analysis revealed that the active caries was strongly associated with the high intake of saccharose and by the presence of three isolates of *S. mutans* in the same individual. The following factors were the most important for the epidemiological evaluation of the disease in low-income families: “mother and son”, “age”, “number of teeth affected by the disease”, “level of school education of parents”, “presence of active caries”, and “high saccharose intake.” Both intra- and inter-familial genetic variability was observed, where the intrafamilial distribution was different in each family. Multiple infections might have occurred in some individuals, an interpretation supported by the great variability detected by RAPD markers. The existence of four isolates from different individuals in the same family, showing 100% similarity suggests their intrafamilial transmission.

**Key Words:** *Streptococcus mutans*, dental caries, RAPD.

## INTRODUÇÃO

A doença cárie é uma das patologias infecciosas mais comuns que afligem humanos com tendência a se manter sem tratamento principalmente em áreas subdesenvolvidas, e tem sido alvo de preocupação constante em programas que visam melhoria da saúde pública (WHO, 1994).

A multiplicidade de variáveis extra-odontológicas que condiciona a existência ou não desta doença, influi também no ritmo e velocidade de sua expansão. O desenvolvimento econômico, a ideologia do Estado, a forma de organização do governo, o nível educacional da população, assim como padrões de cultura e de tradição popular regulam a formação de hábitos alimentares e as condutas de higiene pessoal e coletiva, fazendo parte íntima do processo saúde-doença.

A promoção de saúde bucal representa assim, uma estratégia mediadora entre pessoas e ambiente, combinando escolha pessoal e responsabilidade social em saúde para criar um futuro mais saudável. Em Curitiba, desde 1995, equipes de saúde bucal vêm atuando no Programa de Saúde da Família (PSF), através de uma estratégia de prestação da assistência à saúde, dentro de uma lógica com maior capacidade de ação, atendendo às necessidades da população com sua atenção centrada na família, entendida e percebida a partir de seu ambiente físico e social. Desde então, o grande desafio tem sido enfocar populações de maior risco social, identificando fatores de risco biológico associados ao desenvolvimento da cárie dental.

O risco biológico pode ser verificado através de estudos que demonstram que o *S. mutans* está associado à cárie em seres humanos e que há uma correlação, significativa e positiva, entre o número desta bactéria na saliva e o risco ao desenvolvimento da doença. Além do que, autores relatam que a redução de cáries em crianças foi acompanhada pela redução nos níveis salivares da bactéria; da mesma forma a redução da atividade de cárie em mulheres grávidas, leva a menor colonização e concomitantemente diminuição dos índices de cárie em suas crianças (BALAKRISHNAN, et al., 2000). Porém o *S. mutans* é amplamente distribuído não apenas em populações de moderada ou



alta incidência de cárie (ZICKERT et al., 1982; BEIGHTON et al., 1987) como também em populações que não apresentam ou têm baixo índice da doença (CARLSSON et al., 1985; MATEE et al., 1993), o que demonstra que a simples colonização por estes microrganismos não implica no desenvolvimento da cárie (BRATTHALL, 1992), onde os fatores endógenos do hospedeiro como fluxo e capacidade tampão da saliva, presença de imunoglobulinas salivares, bem como os fatores exógenos como dieta e higiene bucal, estariam interagindo para o estabelecimento da doença.

Variações nos fatores de virulência de *S. mutans* também podem influenciar o desenvolvimento da doença (CAUFIELD, 1997). Fatores como a acidogenicidade, aciduricidade, e a síntese de glicanos insolúveis (GI) a partir da sacarose, estão relacionados à capacidade do *S. mutans* em colonizar as superfícies dentais e induzir a cárie (SMITH et al., 1998). MATTOS-GRANER (1999), demonstrou uma correlação positiva entre a síntese de glicanos insolúveis e a capacidade de adesão ao vidro em isolados de *S. mutans* de crianças com cárie ativa, sugerindo haver presença de genótipos mais virulentos em indivíduos que desenvolvem cárie dental.

Durante o processo evolutivo, o *S. mutans* desenvolveu características fisiológicas e morfológicas que o tornou o microrganismo de maior cariogenicidade da microbiota bucal. Além de possuir várias estruturas que facilitam sua aderência, como glicocálice e fimbrias, o *S. mutans* apresenta enzimas, como a glicosiltransferase e a frutossiltransferase, capazes de converter moléculas de açúcares, como a sacarose, em polímeros extracelulares, responsáveis pela sua aderência às superfícies dentárias e agregação com outros microrganismos na cavidade bucal.

Desta forma, a doença cárie é mais freqüente e extensa quando obtida através da associação do *S. mutans* com a microbiota da boca, demonstrando assim, a participação efetiva desta interação na etiologia (BRATTHALL & CARLSON, 1988; KOGA et al., 1995).

Buscando identificar esta etiologia, tem sido demonstrada a existência de diferentes genótipos na cavidade bucal, correlacionados à doença, utilizando para tal, diferentes técnicas moleculares como a eletroforese de isoenzimas – MEE (GILMOUR et al., 1987; NAPIMOGA et al., 2004) e análise por enzima de restrição – REA.

Marcadores baseados na técnica de PCR (reação de polimerização em cadeia) têm sido utilizados na identificação dos diferentes biosorotipos do grupo mutans e a predominância destes frente à microbiota bucal (OHO et al., 2000; GRONROOS & ALALUUSUA, 2000; MARCHANT et al., 2001; LI, et al., 2001; HUANG, et al., 2001; IGARASHI et al., 2001; OKADA et al., 2002). Dentre estes, os marcadores de RAPD têm sido utilizados no estudo do polimorfismo e distribuição de populações de *S. mutans* da cavidade bucal e placa bacteriana (CAULFIELD & WALKER, 1989; SAARELA et al. 1993; SAARELA et al. 1996; LI & CAULFIELD, 1998; TRUONG et al., 2000; EMANUELSSON et al., 2001; GONÇALVES et al., 2002; KAMIYA, 2003; KLEIN et al., 2004; NAPIMOGA et al., 2004).

Estudos da distribuição intrafamiliar de biosorotipos de *S. mutans* em indivíduos, utilizando marcadores moleculares, visando esclarecer sua possível aquisição e rota de transmissão em humanos, indicam que a mãe é a maior fonte de infecção (BERKOWITZ, JORDAN e WHITE, 1975; BERKOWITZ & JONES, 1985; CAUFIELD & WALKER, 1989; CAUFIELD et al., 1988, 1993; LI & CAUFIELD, 1995; LI, et al., 2000), sugerem a possibilidade de transmissão e aquisição em adultos (MASUDA et al., 1985; SAARELA et al., 1993; BOWDEN & HAMILTON, 1998), demonstram o papel do pai na rota de transmissão (EMANUELSSON et al., 1998; EMANUELSSON & WANG, 1998), e ainda apontam uma rota de transmissão fora da família (DAVEY & ROGERS, 1984; JORDAN & VAN HOTE, 1985). Não foi ainda esclarecido se existem diferenças entre países e populações distintas, para a distribuição intrafamiliar (EMANUELSSON et al., 1998; EMANUELSSON & WANG, 1998).

Dentro deste contexto esse trabalho visou estudar a variabilidade genética de isolados de *S. mutans* e seu possível padrão de transmissão, em famílias de baixa renda atendidas pelo Programa de Saúde da Família (PSF) de Curitiba-PR-BR.

## 2 OBJETIVOS

A partir de isolados de *Streptococcus mutans*, obtidos de amostras salivares de indivíduos, atendidos pelo Programa de Saúde da Família de Curitiba, objetivou-se:

- identificar parâmetros sócio-econômicos, culturais e biológicos que mais contribuem na análise da doença cárie.
- associar o padrão microbiológico como um critério da avaliação da transmissibilidade.
- verificar o polimorfismo genético entre isolados das diferentes famílias.
- detectar a presença de biosorotipos específicos intrafamiliar.
- avaliar os diferentes biosorotipos de *S. mutans* por meio de bioquimismo e marcadores RAPD, e estabelecer o grau de similaridade entre os isolados intrafamiliar.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CÁRIE DENTAL

A doença cárie possui uma etiologia multifatorial, ou seja, é causada pela associação de três fatores primários causais: o hospedeiro, a microbiota e a dieta (KEYS, 1960) juntamente com o fator secundário, o tempo (NEWBRUN, 1988).

A cárie dentária é uma das doenças infecciosas, transmissíveis mais prevalentes em humanos e uma das mais dispendiosas, em relação ao tratamento sintomático restaurador (LOESCHE, 1986). Além disso, o tratamento das lesões de cárie é ineficaz para o controle e eliminação da doença.

Muitas pesquisas têm sido realizadas com o *S. mutans*, sustentando a sua relação com a cárie dental (NEWBRUN, 1988), existindo uma correlação entre o número de lesões de cárie e este microrganismo na saliva, considerando o número de superfícies dentais colonizadas e a intensidade da infecção destas superfícies (DUCHIN & VAN HOUTE, 1978; LINDQUIST, 1991).

Esta bactéria tem sido encontrada em praticamente todos os indivíduos incluindo aqueles que apresentam desde alta, média, até baixa prevalência de cárie (CARLSSON et al., 1985), porém a simples detecção destes microrganismos na saliva ou placa dental não justifica o desenvolvimento da doença. Deve-se levar em consideração, sua natureza multifatorial. A dieta com alto teor de sacarose e a qualidade e frequência da higiene bucal, associada ao tempo, são fatores essenciais na determinação da ocorrência da doença. Assim, a epidemiologia da cárie dental é influenciada pelas próprias condições sócio-econômicas, culturais e ambientais de uma população além da presença de *S. mutans* (BRATTHALL, 1992; MATTOS-GRANER et al., 2001).

Dentre as várias formas de manifestação das lesões cariosas há que se destacar a “cárie de mamadeira”, que acomete crianças de aproximadamente um a três anos de idade que recebem aleitamento natural ou artificial noturno e não realizam higiene bucal adequada. Essas lesões são bastante agressivas e de progressão rápida, podendo ser controlada, se for instalado controle rigoroso do

padrão dietético e hábitos de higiene bucal, além de terapia com flúor. Essas medidas devem envolver todo o núcleo familiar num processo de mudança de comportamento (FRAIZ, 1993; BÖNECKER et al., 1997; FRAIZ e WALTER, 2001).

A colonização precoce dos dentes por *S. mutans*, é fator de risco conhecido e que predispõe a cárie na dentição decídua (MATTOS-GRANER et al., 2000). Além disso, o consumo excessivo de carboidratos propicia meio adequado à proliferação desses microrganismos produtores de ácidos que levam a desmineralização do esmalte. Porém a progressão da doença cárie depende de hospedeiro suscetível, microbiota patogênica e dieta rica em carboidratos, interagindo em condições críticas num determinado período de tempo (YAZAKI et al., 1999; PETTI & HAUSEN, 2000).

### 3.2 *Streptococcus mutans*

Os estreptococos do grupo mutans foram isolados no início do séc. XX, e descritos como estreptococos “mutantes”, visto que apresentavam morfologia celular mais achatada que outros (MATTOS-GRANER, 1999).

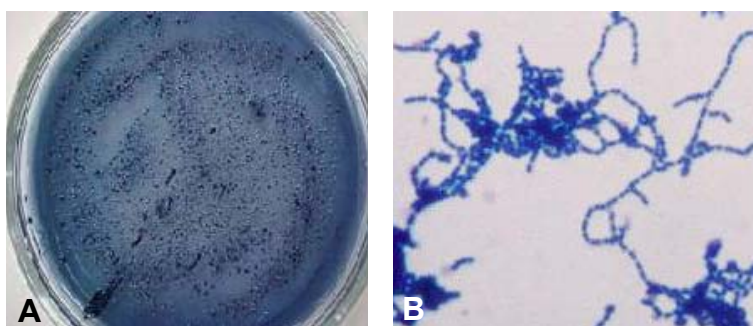
CLARKE, em 1924, isolou um estreptococo de lesão de cárie, associando-o a etiologia da cárie. Este microrganismo apresentava uma forma mais oval que esférica, parecendo ser uma forma mutante do estreptococo. Foi então denominado de *S. mutans*. Clarke tentou provar a associação deste estreptococo com a cárie dental, mas como outras pesquisas não confirmaram esta hipótese, o interesse no *S. mutans* diminuiu.

Na década de 1960, o desenvolvimento de pesquisas com animais gnotobióticos estimulou estudos na microbiologia da cárie dental e o *S. mutans* foi convincentemente conectado à doença (HAMADA, 1986). Os estreptococos do grupo mutans emergiram então como importantes agentes patogênicos, associados com o início e a patogenia da cárie dental.

### 3.2.1 Caracterização Biológica

As bactérias *S. mutans* são cocos Gram positivos, com morfologia ovalada, medem aproximadamente 0,5 a 0,75  $\mu\text{m}$  de diâmetro, agrupam-se aos pares ou em cadeias, requerem meios nutricionalmente ricos para seu crescimento e temperatura média de 37°C. Em meio de cultura ágar Mitis Salivarius acrescido de bacitracina (AMSB), formam colônias pequenas, com bordos irregulares, fortemente aderidas ao meio. Com adição de sacarose ao ágar, muitas linhagens de *S. mutans* produzem colônias de cerca de 1 mm de diâmetro (Figura 1).

FIGURA 1 - MACRO E MICRO MORFOLOGIA DE *Streptococcus mutans*



A - Característica das colônias em ágar Mitis Salivarius, com adição de sacarose, bacitracina e telurito de potássio; B - Micromorfologia característica de *S. mutans*, coloração de Gram, aumento 1000X.

Fonte: O autor.

Quando cultivados em ágar sangue e microaerofilia por 48 horas, as colônias de *S. mutans* apresentam-se brancas ou cinzas, circulares ou irregulares com 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, tendendo a aderir na superfície do ágar. O meio de cultura mais freqüentemente utilizado para o isolamento primário de *S. mutans* é o ágar Mitis Salivarius com adição de sacarose, bacitracina e telurito de potássio (GOLD et al., 1973). A identificação de *S. mutans* é baseada na sua morfologia à microscopia ótica e características de crescimento específicas quanto ao padrão enzimático e assimilação de açúcares (GRÖNROOS, 2000; KONEMAN et al., 2001).

A partir do conhecimento dessas características próprias do *S. mutans*, é importante ressaltar o reconhecimento da existência de biosorotipos variáveis, sendo reunidos em um grupo denominado de mutans. Os estreptococos do grupo mutans foram originalmente descritos como uma única espécie: *S. mutans*, dividida em oito subgrupos designados de *a* a *h* em função da especificidade sorológica dos antígenos de carboidratos da parede celular. Mais tarde, esses vários sorotipos foram classificados em categorias de espécies independentes: *S. mutans* (que inclui os sorotipos: *c*, *e*, *f*) e *S. sobrinus* (sorotipos *d* e *g*), membros do grupo mutans que predominam no homem (BENTLEY et. al., 1991) (Tabela 1).

TABELA 1 -CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DAS ESPÉCIES DE ESTREPTOCOCOS DO “GRUPO MUTANS”, OS SOROTIPOS E A PRINCIPAL FONTE DE ISOLAMENTO

Características	Espécie de <i>Streptococcus</i>				
	<i>mutans</i>	<i>cricetus</i>	<i>sobrinus</i>	<i>rattus</i>	<i>macacae</i>
Fermentação de - manitol	+	+	+	+	+
- sorbitol	+	+	d	+	-
- melibiose	+	d	d	+	+
- rafinose	+	+	d	+	-
Hidrólise de - arginina	-	-	-	+	-
- esculina	+	d	d	+	-
Produção de -H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	+	-	-
Resistência à bacitracina -2UI/mL	+	-	+	+	-
Sorotipo	c,e,f	a	d, g	b	H
Fonte	homem	hamster homem ratos	homem	ratos	macaco
% de isolamento no homem	90%	raro	7-35%	raro	0%

Legenda: (+) 90% das cepas ou mais positivas, (-) 90% das cepas ou mais negativas, (d) proporção substancial difere. Baseado em MAYER (1989), com modificações.

O grupo mutans, por sua vez, pertence a um grupo maior, o grupo dos estreptococos viridans, o qual inclui várias espécies de estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos e não hemolíticos; a maioria dos quais são parte da microbiota normal do trato respiratório superior, genital e orofaringe.

Assim, além do grupo mutans, que compreende os isolados de origem humana *S. mutans* e *S. sobrinus*, mais algumas espécies de origem animal como *S. cricetus*, *S. rattus* e *S. macacae*, os estreptococos viridans incluem outros grupos como: salivarius (*S. salivarius* e *S. vestibularis*), mitis (*S. mitis* e *S. oralis*) e sanguis (*S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. parasanguis* e *S. crista*) (FRANDSEN et al., 1991; KONEMAN, 2001).

Os *S. mutans*, *S. sobrinus* e outros membros de estreptococos bucais do grupo mutans são capazes de produzir enzimas denominadas glicosiltransferases, que hidrolisam a sacarose da dieta em glicose e frutose, e unem os resíduos de glicose entre si por meio de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 e  $\alpha$ -1,4 para formar glicanos insolúveis. Esses glicanos conferem aos microrganismos a capacidade de aderir às superfícies lisas dos dentes e formar a matriz do biofilme dental. A aderência específica de *S. mutans* e de outros microrganismos aos glicanos aderentes e insolúveis e a subsequente formação de ácidos, promovem a desmineralização do esmalte dentário e o início das lesões de cárie (LOESCHE, 1986; GRÖNROOS, 2000).

Além disso, o *S. mutans* também parece produzir maior quantidade de ácidos a partir de carboidratos, do que outras bactérias bucais, porque são capazes de fermentar grande variedade de açúcares e são mais resistentes aos ácidos que outros estreptococos bucais. Esses microrganismos também sintetizam polissacarídeos intracelulares que podem ser metabolizados para produzir ácidos na ausência de carboidratos fermentáveis exógenos (GRÖNROOS, 2000).

### 3.2.2 Identificação

A seqüência completa do genoma do *S. mutans* (ADJIC et al., 1999), possibilitou um melhor entendimento da complexidade e especificidade genética deste organismo. Este agente difere de outros patógenos humanos do gênero como: *S. pyogenes* e *S. pneumoniae*, que embora façam parte da flora bucal humana, são apenas incidentalmente patógenos bucais.



De acordo com a análise do seu genoma o *S. mutans* é capaz de metabolizar a mais vasta variedade de carboidratos, do que qualquer outro organismo Gram-positivo seqüenciado até hoje, podendo sintetizar todos os seus aminoácidos necessários. O número de proteases, peptidases e outras exoenzimas produzidas pelo *S. mutans* claramente sugerem que ele obtém recursos dos tecidos de seu hospedeiro. A análise da seqüência genômica mostrou que aproximadamente 16% de seus ORFs (*Predicted Protein-Encoding Open Reading Frames*) especificam genes únicos e revelaram a prevalência de muitos genes não caracterizados previamente como envolvidos na virulência, transporte e regulação gênica. Estas descobertas provêm base para o desenvolvimento futuro de drogas e novas abordagens na prevenção e tratamento da cárie dental.

Outros métodos de identificação também podem ser utilizados como: anticorpos monoclonais, análise de DNA através de detecção de genes específicos como o gene  $\beta$ -glicosiltransferase (*gtfB*), gene frutossiltransferase (*ftf*) e gene dextranase (*dexA*).

### 3.2.3 Fatores de Virulência

O termo virulência é descrito como a capacidade de um microrganismo causar doença em um hospedeiro. A relação entre hospedeiro e microrganismo é dinâmica, dependente de suas características individuais e do inter-relacionamento com fatores externos. A virulência de uma bactéria consiste em propriedades que promovem sua entrada, colonização e crescimento no hospedeiro. Dentre os estreptococos do grupo mutans, o *S. mutans* é considerado o de maior relevância devido seus fatores de virulência, e vem sendo descrito como agente etiológico da cárie dental (HAMADA et al., 1980; LOESCHE, 1986).

GIBBONS (1984) relatou que o potencial cariogênico de *S. mutans* é principalmente dependente das suas altas propriedades acidogênicas e da habilidade de se acumular nos dentes, principalmente devido à síntese de glicanos extracelulares a partir da sacarose.

A produção de ácidos e a capacidade de metabolização de substratos em meio ácido, foram os primeiros fatores de virulência atribuídos a microrganismos específicos relacionados à etiologia da cárie (LOESCHE, 1986; KÖHLER et al., 1995).

Alguns estudos demonstraram que existem diferenças na capacidade de produção de ácidos entre as diferentes espécies de estreptococos do grupo mutans. DE SOET et al. (1991), observaram que os *S. sobrinus* eram mais acidogênicos do que os *S. mutans* em animais gnobióticos. KÖHLER et al. (1995), detectaram diferenças na produção de ácidos entre linhagem de *S. mutans* isoladas de humanos. Embora tenham observado grandes variações entre linhagens de *S. mutans* isoladas de diferentes indivíduos, os autores não foram capazes de associar o potencial acidogênico com o número de lesões de cárie presentes nos indivíduos colonizados por estes microrganismos.

Entretanto, KÖHLER e KRASSE (1990) observaram que linhagens de *S. mutans* isoladas de crianças livres de cárie portadoras de altos níveis de estreptococos do grupo mutans demonstraram baixa cariogenicidade em modelos animais, quando comparadas com outras linhagens da mesma espécie, isoladas de crianças altamente infectadas e com altos índices de cárie dental. Outros estudos demonstraram grande variabilidade na cariogenicidade de linhagens isoladas de humanos em modelos animais (DE SOET et al., 1991), mas pouco se sabe sobre os fatores bacterianos relacionados a estas diferenças (BOWDEN, 1997).

A influência de fatores de virulência de *S. mutans* e *S. sobrinus* na capacidade de colonização e indução da cárie dental poderia ser mais facilmente observada em populações mais homogêneas quanto às características sócio-econômicas, hábitos dietéticos, de higiene bucal e exposição ao flúor (MATTOS-GRANER, 1998).

VAN HOUTE et al. (1996), avaliaram o pH final do meio de cultura rico em sacarose, após cultivo de amostras de placa bacteriana de superfícies dentárias com diferentes condições clínicas (lesões de cárie, lesões de manchas brancas em esmalte, lesões de cárie ativa e superfícies hígidas) e observaram que quando *S. mutans* estava presente em maior concentração na placa, foram detectados os menores valores de pH, em torno de 4,2, coincidindo com as amostras de placa das superfícies dentárias com lesões, sugerindo que a cariogenicidade da placa é dependente do aumento na proporção de organismos acidogênicos e acidúricos.

Além da tolerância aos ácidos e produção de ácidos, os *S. mutans* ainda possuem como mecanismos de virulência, a capacidade de sobrevivência no biofilme dental devido à alta capacidade de adaptação ao ambiente, presença de adesinas na superfície celular, produção de glicosiltransferases, mutacina e polissacarídeos extracelulares.

Em adição a esses fatores, outras propriedades podem influenciar a virulência de *S. mutans*, entre elas a atividade proteolítica capaz de degradar colágeno dos substratos (HOMER et al., 1990, JACKSON et al., 1997).

Enzimas associadas à célula do microrganismo utilizam sacarose como substrato, separando-a em glicose e frutose, e por fermentação clássica produzem energia e grande quantidade de ácido láctico. Algumas moléculas de glicose provenientes da sacarose são convertidas em polissacarídeo intracelular de alto peso molecular (amilopectina ou glicogênio), este processo proporciona armazenamento de material para o metabolismo energético quando nenhum substrato exógeno for encontrado. Além disso, os *S. mutans* podem produzir hidrolases glicosídicas que extraem hidratos de carbono da saliva para utilização como fonte de energia (GRÖNROOS, 2000).

MATTOS-GRANER et al. (2000), avaliaram algumas características fenotípicas de virulência de *S. mutans*, isolados de crianças com e sem atividade de cárie e observaram uma relação positiva entre a produção de glicanos insolúveis e a capacidade de adesão ao vidro, sugerindo que as linhagens de crianças com alta atividade de cárie podem colonizar mais eficientemente, induzindo mais facilmente a cárie dental.

Avaliando a diversidade dos isolados de *S. mutans* em indivíduos livre de cárie e com presença de cárie ativa, NAPIMOGA (2004) concluiu em seu estudo que indivíduos cárie ativos albergavam um maior número de genótipos de *S. mutans* com alta capacidade de sintetizar glicanos insolúveis, quando comparado com genótipos isolados de indivíduos livres de cárie.

### 3.2.4 Colonização por *Streptococcus mutans*

Em geral, a aquisição de microrganismos pelo corpo humano ocorre por contato direto entre um hospedeiro e outro, ou através de objetos inanimados, como chupetas e brinquedos. A saliva é a principal via de transmissão de *S. mutans* (KÖHLER & BRATTHALL, 1979), e a mãe é considerada a mais importante fonte de infecção para as crianças (LI & CAUFIELD, 1995; KLEIN et al., 2004), embora outros estudos tenham sugerido haver outras formas de aquisição (MATTOS-GRANER et al., 2001).

Após a colonização por esta bactéria, os níveis salivares de *S. mutans* tendem a se manter estáveis nos indivíduos analisados. MALTZ e ZICKERT (1982) observaram que o uso de 1 a 3,2g/dia de penicilina V oral por 10 dias, diminuiu o número de *S. mutans* de  $2,4 \times 10^6$  para  $6,8 \times 10^3$ /mL de saliva. Entretanto, dois dias após a última administração do antibiótico, a contagem de *S. mutans* era quase a mesma que antes do tratamento, demonstrando que a colonização de *S. mutans* em humanos está diretamente relacionada aos fatores endógenos do hospedeiro.

Uma correlação significativamente alta tem sido demonstrada entre o número de estreptococos do grupo mutans na saliva e sua prevalência na dentição, em termos de número de superfícies dentais colonizadas e nível de infecção das superfícies dentais (DUCHIN & VAN HOUTE, 1978; LINDQUIST, 1991).

A detecção de *S. mutans* na saliva de indivíduos dentados é bastante elevada. KOGA-ITO et al. (2003), analisando uma população de crianças respiradoras bucais encontraram uma prevalência de 75%. NAPIMOGA (2004), analisando a clonalidade de *S. mutans* em pares mãe e filho encontrou prevalência de 80% nas amostras salivares das crianças e 100% nas amostras salivares das mães. AZEVEDO et al. (1988), avaliando as espécies de estreptococos do grupo mutans isolados de amostras salivares em pares mãe e filho detectou 94% de *S. mutans* nas crianças e 100% nas mães.

Porém, os processos iniciais de colonização da cavidade bucal incluem a introdução de diversas populações microbianas. Bactérias do gênero *Streptococcus* do grupo viridans (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius*) podem ser considerados alguns dos pioneiros nesse processo, porém alguns organismos variam de acordo com as condições endógenas do hospedeiro (LI e CAUFIELD, 1995).

A colonização inicial por *S. mutans* na superfície bucal envolve interações entre a superfície da célula bacteriana e receptores da película adquirida, este mecanismo é considerado sacarose-independente. Em seguida, com a entrada a sacarose, a célula bacteriana ativa as enzimas glicosiltransferases que sintetizam glicanos extracelulares intensificando as ligações e o acúmulo de bactérias resultando numa massa microbiana tenaz, a placa bacteriana.

Segundo ANTONY e MUNSHI (1997), o *S. mutans* é acidúrico e tem requerimento nutricional simples, mas isto não pode ser o determinante primário para sua colonização. A produção de polissacarídeos a partir da sacarose pode facilitar a colonização de superfícies lisas dos dentes pelo *S. mutans*. Mas esta colonização parece ser uma consequência tardia da colonização inicial de fóssulas e fissuras. O *S. mutans* requer uma superfície não escovada ou limpa para sua colonização.

Ainda com relação aos fatores dietéticos, não há dúvida que o principal componente da dieta envolvido na etiologia da cárie dental é a sacarose (LOESCHE, 1986; TANZER, 1992). Estudos *in vitro* demonstram que a presença freqüente de sacarose propicia quedas constantes do pH, favorecendo microrganismos acidúricos como estreptococos do grupo mutans e lactobacilos (BRADSHAW & MARSH, 1998). Mais relevante é o fato que a sacarose é o único substrato a partir do qual são produzidos polissacarídeos extra-celulares (PEC) por estreptococos do grupo mutans, sendo que os PEC insolúveis em água (glicanos) são importantes para a colonização e acúmulos destas bactérias nas superfícies dentárias (TANZER, 1992; HAJISHENGALLIS & MICHALEK, 1999).

Os mecanismos precisos pelos quais os *S. mutans* são capazes de colonizar e se acumular nas superfícies dentárias ainda vêm sendo esclarecidos.

Duas fases distintas, aparentemente independentes, parecem caracterizar a colonização dos dentes. A fase primária ou inicial de colonização é dependente da interação específica de proteínas da película adquirida do esmalte com moléculas de superfície da célula bacteriana, denominadas adesinas. A segunda fase de colonização é denominada fase de acúmulo e propicia o aumento do número de células bacterianas na placa dental, sendo importante para a produção de ácidos, o que favorece os processos de desmineralização dental. O acúmulo de *S. mutans* nas superfícies dentárias envolve diferentes processos de interação, coaderência e coagregação com outros microrganismos bucais (KOLENBRANDER & LONDON, 1993).

CAULFIED et al. (1993), em estudo longitudinal de 46 crianças desde o nascimento até cinco anos de idade, detectaram *S. mutans* em 21% das crianças aos 19 meses de idade e em 62% das crianças aos 31 meses de idade. Entre as crianças não infectadas até os 31 meses de idade todas se mantiveram livres de *S. mutans* até cinco anos de idade. Estes autores sugeriram que o período crítico para implantação de *S. mutans* na cavidade bucal corresponderia ao intervalo entre 19 e 31 meses de idade o qual foi denominado de “janela de infectividade”, que coincide com a erupção dos molares decíduos.

Segundo ALALUUSUA et al. (1996), a maior diversidade genética de estreptococos do grupo mutans observada em crianças com cárie de mamadeira, deve-se às condições propícias do ambiente para o estabelecimento de múltiplos genótipos. Entretanto, contrário a esta posição, KREULEN et al. (1997), verificaram que crianças com lesões de “cárie rampante” apresentavam apenas uma linhagem de *S. mutans* enquanto os respectivos irmãos, sem lesões de cárie, apresentavam de duas a cinco linhagens, sugerindo que clones específicos de *S. mutans* são selecionados em cavidades orais com atividade de cárie.

### 3.2.5 Transmissibilidade de *S. mutans*

Em 1980, HAMADA et al., coletaram placa da superfície dental e dentina cariada de dez pacientes com atividade de cárie, os quais possuíam de quatro a nove anos, tendo como resultado 66% de prevalência de *S. mutans* sorotipo C. Ocasionalmente o mesmo sorotipo estava presente nas amostras dentais e fecais. Sorotipos raros (e, f, g) foram encontrados em dois sujeitos, e também em seus irmãos e mães, sugerindo transmissão intrafamiliar da bactéria.

FITZGERALD et al. (1983), baseados na estimativa de UFC/mL de saliva, em indivíduos de 60 a 87 anos (40% edêntulos, com prótese superior e inferior) e testes de patogenicidade com estes isolados in vivo, com modelo de hospedeiro animal (hamsters), verificaram um grau de variação na virulência e cariogenicidade entre diferentes isolados. Desta forma, sugeriram que idosos podem servir, juntamente com pais e irmãos, como vetores na transmissão inicial de microrganismos para bebês.

Em uma avaliação realizada na Inglaterra, em dez famílias, incluindo 40 pessoas, observou-se que 78% dos adultos e 46% das crianças infectadas apresentavam múltiplos biotipos de *S. mutans*. A maioria dos pais não compartilhava linhagens com outros da família, mas todas as crianças tinham pelo menos uma linhagem em comum com a mãe, sendo ela confirmada como a maior fonte de infecção por *S. mutans* em crianças pequenas (DAVEY & ROGERS, 1984).

Isolados obtidos de cinco famílias, envolvendo 58 indivíduos, foram avaliados a partir da digestão total do DNA, e o padrão de restrição observado, indicou freqüente infecção intrafamiliar (KULKARNI et al., 1989).

EMANUELSSON; LI; BRATTHALL (1998) avaliaram amostras da placa oclusal e bucal de crianças dinamarquesas e respectivos pais. Foi realizada sorotipagem pela técnica de imunofluorescência e genotipagem usando endonuclease de restrição *HaeIII*. Os resultados mostraram que cinco crianças tinham *S. mutans* diferentes de seus pais; seis crianças apresentaram genótipos idênticos aos das mães e nenhuma criança apresentou genótipo similar ao do pai. Nenhuma coincidência de genótipo foi observada entre os casais. Os resultados sugerem que a criança adquire *S. mutans* tanto fora quanto dentro da família.

Segundo PACKER et al. (1999), em estudo com 50 crianças brasileiras entre dois a seis anos de idade, atendidas na clínica odontológica da FOU SP, os hábitos relacionados à possível transmissibilidade de estreptococos do grupo mutans, dos cuidadores para as crianças foram: beijar na boca dos pais, irmãos e, ou babás; usar o mesmo talher que pais, irmãos e, ou babás; colocar a mão suja na boca. Deve-se ressaltar que o estabelecimento de um determinado grupo bacteriano na cavidade bucal depende dos fatores endógenos do hospedeiro, tais como pH, capacidade tampão e fluxo salivar, características do esmalte dentário, presença de imunoglobulinas secretoras na saliva, produtos metabólicos bacterianos, e flora normal; estando fortemente vinculado à saúde geral do hospedeiro, além de fatores como higiene e dieta, associados ao tempo.

Em famílias caucasianas foram isoladas 30 linhagens de *S. mutans* na saliva, sendo testadas para a atividade da bacteriocina, concluindo-se que nenhuma relação pode ser encontrada entre a atividade bacteriocina das linhagens de *S. mutans* e a probabilidade de transmissão intrafamiliar (LOVEREN et al., 2000).

Amostras da placa bacteriana bucal e oclusal, coletadas de 11 famílias suecas, genotipadas com digestão do DNA utilizando a endonuclease de restrição *HaeIII*, cujo padrão do DNA “*fingerprinting*” inicial e de dois a cinco anos após a coleta foram comparados, demonstraram um grau considerável de persistência das linhagens. Porém neste estudo, alguns indivíduos ganhavam ou perdiam genótipos (REDMO & THORNQVIST, 2000).

PIMENTA et al. (2001), avaliaram três gerações brasileiras, sendo o *S. mutans* isolado na saliva de 86% dos indivíduos, as contagens na saliva variando de  $3 \times 10^2$  a  $1,6 \times 10^8$  UFC/mL. Todos adultos estavam colonizados, mas em apenas 35% das crianças a bactéria foi detectada. Devido à alta prevalência do *S. mutans* na saliva dos membros da família, sugeriu-se o risco de transmissão intrafamiliar.

Em um estudo envolvendo 25 famílias suecas e 11 chinesas, utilizando análise do DNA total por enzima de restrição (REA) e marcadores RAPD dos isolados de *S. mutans* da saliva, verificou-se o mesmo genótipo de *S. mutans* em 44% dos pares, mãe/ filho suecos, indicando que mães e indivíduos fora da família eram as fontes de contaminação. A distribuição do genótipo nas famílias chinesas apontou para o fato de que os pais tiveram um papel mais pronunciado como fonte de *S. mutans* comparado com as famílias suecas. A distribuição intrafamiliar do *S. mutans* pareceu ser diferente nos dois grupos de famílias com diferentes contextos culturais (EMANUELSSON, 2001).

Na China, foram coletadas saliva não estimulada e amostras de placa oclusal e gengival. A amostra foi composta de 11 casais, sendo o mesmo procedimento repetido após três meses. Os isolados foram sorotipados por testes bioquímicos e genotipados usando *HaeIII*, concluindo-se que os casais podem ter sido infectados por linhagens de outras pessoas, assim como o *S. mutans* inoculado por contato, porém não necessariamente se tornou parte permanente da flora indígena (NIE; FAN; BIAN, 2002), demonstrando mais uma vez a importância dos fatores endógenos no estabelecimento do *S. mutans* na cavidade bucal.



TEDJOSASONGKO e KOZAI (2002), utilizaram técnica de genotipagem por DNA *fingerprinting* de isolados de *S. mutans* com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *HaeIII*, sendo analisadas as crianças (0 a 5 anos), os pais e babás. As crianças não tinham cáries durante o estudo. A aquisição de *S. mutans* ocorreu entre oito e 54 meses (média de 24,2). A transmissão entre mãe/filho foi de 33,3%, pai/filho de 8,3%, entre crianças e outros de 58,4%, porém não houve evidência da transmissão pelas babás. Este estudo sugere que o meio ambiente da criança também tem um papel na transmissão e aquisição inicial de *S. mutans*, associados aos fatores endógenos do hospedeiro.

Em 2003, SPOLIDORIO et al., selecionaram 22 famílias brasileiras, coletando amostras de saliva e da placa dental. O polimorfismo genético foi pesquisado através da técnica de AP-PCR, utilizando-se o *primer* OPA-13. Os fragmentos de DNA obtidos foram amplificados e comparados, através de eletroforese em gel de agarose, sendo que em três famílias analisadas o pai apresentou linhagens com similaridade genética às dos bebês. Em 12 famílias a mãe apresentou linhagens com similaridades às dos bebês e sete bebês apresentaram linhagens com similaridade ao irmão mais velho. Concluiu-se que esta técnica de AP-PCR foi eficaz em demonstrar a heterogeneidade genética de *S. mutans* na população estudada.

Outro estudo com 200 gêmeos suecos, monozigotos e dizigotos, de 14 a 15 anos, quatro colônias características de *S. mutans* de cada indivíduo foi genotipada através de análise RAPD. Concluiu-se que os níveis de colonização, bem como amostras genotípicas foram mais consistentes em pares monozigóticos, indicando que os fatores genéticos do hospedeiro têm um papel importante na aquisição de *S. mutans* durante a infância (REDMO-EMANUELSSON & HAMBERG, 2004).

O estabelecimento de um padrão metodológico para a tipagem genética para este grupo de microrganismos e, no futuro, para outros da cavidade bucal pode ser de fundamental importância em estudos epidemiológicos de populações. Os resultados obtidos abrem a possibilidade de investigação de diferentes populações e para melhor compreensão dos mecanismos da transmissão intrafamiliar da microbiota bucal.

### 3.3 MARCADORES MOLECULARES

A variabilidade genética de microrganismos pode ser detectada por análise do fenótipo ou por marcadores moleculares. A primeira, considerada clássica, baseia-se na caracterização morfológica ou bioquímica, restringindo os estudos em populações. As técnicas moleculares, por sua vez, fornecem ferramentas para evidenciar, e entender melhor, diversos aspectos relacionados diretamente ou indiretamente ao DNA. Desta forma, a análise dos ácidos nucleicos vem sendo amplamente utilizada na diferenciação de indivíduos e no esclarecimento filogenético dos organismos estudados (STRINGARI, 2004).

Os dados moleculares freqüentemente complementam e confirmam hipóteses baseadas em estudos de morfologia. Porém em alguns casos os dados obtidos com a análise de DNA são conflitantes com aqueles gerados por análises exclusivamente fenotípicas. Esta contradição pode ser observada principalmente na classificação taxonômica de microrganismos (SAMUELS & SEIFERT, 1995).

Existem diversas técnicas de biologia molecular que estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético, como: análise de plasmídeos, análise com enzimas de restrição, AP-PCR/RAPD e ribotipagem. Em microbiologia bucal, a análise de DNA baseada em traços do genótipo oferece uma rápida e realista identificação das bactérias, comparada com métodos baseados em caracterização do fenótipo.

Estas técnicas permitem a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma de um determinado organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo da genética como na prática de melhoramento.

A tecnologia do DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificação de segmentos de DNA através da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), abriram caminho para uma mudança no paradigma genético clássico: da inferência do genótipo a partir do fenótipo, para a análise genética direta da variação na sequência de DNA.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis na década de 80, possibilitando a produção, *in vitro*, de múltiplas cópias de seqüências específicas de DNA, sem a necessidade de clonar estes segmentos (ALBERTS et al., 1994). Esta técnica baseia-se na desnaturação do DNA genômico, submetendo-o a altas temperaturas, e deste modo, permitindo que as duas fitas simples originadas sejam duplicadas. Para que esta reação ocorra, é necessário um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples), utilizados como iniciadores (*primers*), que irão se anelar às fitas simples do DNA em sua extremidades 3'OH. Estes *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que flanqueiam a região alvo.

O passo decisivo para a expansão da técnica de PCR ocorreu quando SAIKI et al. (1985) isolaram uma DNA polimerase (*Taq* polimerase) de uma bactéria (*Thermus aquaticus*) que vive em fontes térmicas e cuja enzima polimeriza a 72°C, mantendo assim a atividade por algumas horas a 95° C. Isso possibilitou a completa automatização do processo de PCR (WATSON et al., 1992). Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92°C a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35°C a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência do *primer* utilizado, permitindo hibridização de cada *primer* com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase atinja seu ponto ótimo de atividade, e realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Esta extensão envolve a adição dos quatro nucleotídeos (adenina, citosina, timina e guanina), utilizando como molde a seqüência alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo.

Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de “n” ciclos, são produzidos  $2^n$  duplas fitas de DNA. Esta escala de amplificação permite, portanto, iniciar com quantidades mínimas de DNA e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma seqüência específica de interesse.

Os marcadores moleculares, baseados em PCR, podem ser utilizados no estudo da evolução molecular, na detecção de infecções microbianas através da amplificação do DNA do patógeno com oligonucleotídeos iniciadores específicos ao seu genoma e na medicina forense (WATSON et al., 1992; ALBERTS et al., 1994).

A necessidade do conhecimento prévio da sequência que flanqueia o segmento a ser amplificado para que os nucleotídeos possam ser construídos, é uma das limitações da técnica PCR (WATSON et al., 1992; ALBERTS et al., 1994). Para solucionar este problema desenvolveu-se uma técnica denominada, mais comumente, de RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*). Esta técnica baseia-se na amplificação de segmentos de DNA, por um único *primer* de sequência arbitrária (WILLIAMS et al., 1990).

### 3.3.1 Marcadores RAPD

Dois grupos de pesquisadores, WELSH e McCLELLAND (1990), e WILLIAMS et al. (1990) descreveram simultaneamente e independentemente em 1990 um grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR. WILLIAMS et al. (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD (*Random Amplified Poimorphic DNA*), descrevendo a técnica no contexto da análise Mendeliana, demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento. WELSH e McCLELLAND (1990), por sua vez, propuseram a denominação mais apropriada para a técnica, chamando-a de AP-PCR (*Arbitrarily Primed – Polimerase Chain Reaction*), uma vez que os *primers* possuem sequências arbitrárias, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos do genoma. O experimento deste grupo foi à geração de *fingerprints* genômicos simples e reproduzíveis para a identificação de linhagens, utilizando géis de eletroforese em poliacrilamida de maior poder de resolução juntamente com *primers* um pouco mais longos.

Esta técnica é baseada na amplificação de segmentos do DNA, utilizando o mesmo princípio da PCR (SAIKI et al., 1985). A principal diferença entre a PCR usual e o RAPD está na reação de amplificação que utiliza apenas um único *primer*, com uma sequência arbitrária de dez a 15 bases. A amplificação somente ocorre se este *primer* arbitrário for complementar a um sítio em uma das fitas, e complementar a um mesmo sítio (com orientação invertida) na outra fita de DNA. Os fragmentos amplificados apresentam de 4 a 10 kb, dependendo do limite máximo de amplificação da DNA polimerase empregada (WILLIAMS et al., 1990).

Segundo WILLIAMS et al. (1993), o tamanho ideal do *primer* para a amplificação em RAPD é em torno de dez bases, devendo seu conteúdo GC ser em torno de 50 a 70%, e no mínimo de 40%. Além disso, os *primers* não devem conter sequências palindrômicas a fim de evitar o autopareamento. As concentrações de *primer*, magnésio e DNA, também podem alterar tanto o número como a intensidade das bandas (STRINGARI, 2004).

A técnica RAPD permite caracterizar e avaliar o grau de similaridade genética entre genótipos aos níveis inter e intraespecíficos, sendo altamente sensível a diferenças pequenas de até um único nucleotídeo entre o *primer* e o DNA molde. Permite ainda a obtenção de *fingerprints* genômicos de indivíduos, variedades e populações; a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica, a localização de genes de interesse econômico, e ainda a obtenção de novos marcadores para diagnósticos via PCR (FUNGARO & VIEIRA, 1998; FUNGARO, 2000).

Marcadores RAPD oferecem a possibilidade de amostrar regiões do DNA repetitivo, uma vez que os *primers* utilizados para detecção da variação são arbitrários, ao contrário das sondas RFLP que são pré-selecionadas para regiões de cópia única (WILLIAMS et al., 1993; WANG et al., 1993). RAPD reúne assim a simplicidade, técnica da visualização direta dos marcadores isoenzimáticos, com o poder de resolução dos marcadores de DNA. O uso desta técnica não requer experiência profunda em biologia molecular e nem tão poucas instalações sofisticadas de laboratório. Neste contexto, a técnica RAPD é uma das poucas ferramentas disponíveis que efetivamente permite a análise genética detalhada para um grande número de marcadores (MEGNEGNEAU; DEBETS; HOCKSTRA, 1993).

SAARELA et al. (1996) propuseram o emprego da técnica de AP-PCR na genotipagem de diferentes espécies e sorotipos de estreptococos bucais, os autores observaram, ainda, que os resultados repetiam-se quando os mesmos isolados eram submetidos a ribotipagem, e que o poder discriminatório dessas duas técnicas era superior à simples sorotipagem, gerando maior número de biotipos.

A aplicação da técnica de AP-PCR em estudos de clonalidade individual ou familiar envolvendo estreptococos bucais foi proposta por LI e CAUFIELD (1998), que após um prévio *screening* com vários *primers*, mostraram que esse recurso pode ser de grande valia em levantamentos onde são obtidos mais de um clone bacteriano por indivíduo.

GRONRÖÖS e ALALUUSUA (2000), utilizando a técnica de AP-PCR, identificaram de um a quatro diferentes clones de *S. mutans* em crianças de três a sete anos, além de constatarem que os diferentes clones foram encontrados em diferentes sítios, sugerindo que os mesmos colonizem sítios específicos.

REDMO-EMANUELSSON et al. (2003), investigaram a presença de diferentes genótipos e a estabilidade de *S. mutans*, em diferentes sítios da cavidade bucal de um mesmo indivíduo utilizando a técnica de AP-PCR. Foram encontrados até sete diferentes clones considerando toda a cavidade bucal. Os autores encontraram até quatro diferentes clones em um mesmo sítio, e estes mesmos genótipos foram encontrados em uma segunda avaliação realizada entre quatro a sete meses após a coleta inicial, indicando genótipos estáveis.

A técnica de RAPD foi utilizada para caracterização genotípica de isolados de *S. mutans* e *S. sobrinus*, com o objetivo de monitorar e acompanhar a colonização da cavidade bucal de 16 crianças e suas mães, durante 20 meses. Foi analisado o padrão de transmissão vertical de mãe para filho, a diversidade genotípica e a persistência das linhagens. Como resultado foi obtido um aumento da diversidade genotípica de *S. mutans* na cavidade bucal durante o período de acompanhamento. Alguns genótipos foram adquiridos, alguns persistiram e outros foram perdidos, refletindo o desenvolvimento contínuo da microbiota bucal da criança. (KLEIN et al., 2004).

NAPIMOGA, et al. (2005), em recente estudo usando a técnica de RAPD, encontrou o máximo de oito genótipos de *S. mutans* em indivíduos jovens, que apresentavam cárie ativa.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizadas linhagens de *S. mutans* e *S. sobrinus*, isoladas da saliva de indivíduos pertencentes a nove famílias residentes a Rua Pedro Kogut, Vila Sandra, Cidade Industrial de Curitiba, Curitiba, Paraná, Brasil. A linhagem ATCC de *S. mutans* 25175 foi gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup> Maria Luiza Drechsel Fávero, do Departamento de Farmácia da UFPR; sendo que o microrganismo 25175 da *American Type Culture Collection*, foi identificado como *S. mutans* Clarke, com seu isolamento feito a partir de dentina cariada. As linhagens de *S. pyogenes*, usadas como grupo externo, foram provenientes de isolados de um surto de faringite estreptocócica, Curitiba-PR, identificados pelo LACEN.

### 4.2 ESTERILIZAÇÃO

Os meios de cultura e soluções foram esterilizados em autoclave, com pressão atmosférica de 1 atm por 20 min. Vidrarias foram autoclavadas por 40 min. Frascos, ponteiras e tubos tipo *ependorf* foram autoclavados à pressão de 1 atmosfera, por 15 min e os procedimentos diferenciados foram especificados em cada item. Todo material contaminado foi esterilizado antes do descarte.

### 4.3 MEIOS DE CULTURA

#### 4.3.1 Ágar Mitis Salivarius Sacarosado com Bacitracina e Telurito de Potássio (AMSB)

Ágar Mitis Salivarius	45g
Sacarose	15g
Água Destilada	500mL
Bacitracina (sol. estoque 50.000µg/mL)	0,30mL
Telurito do Potássio (1%)	0,50mL

O pH foi ajustado para 7,3- 7,4. Após a autoclavagem o meio foi resfriado até 50°C, acrescentou-se a bacitracina e o telurito e distribuiu-se em placas de Petri. (GOLD et al., 1973)

#### 4.3.2 Ágar Sangue

Ágar de infusão de cérebro e coração 52g

Água Destilada 1000mL

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 1N.

Após o resfriamento do meio a 50°C, acrescentou-se sangue desfibrinado de carneiro para uma concentração final de 5%.

#### 4.3.3 Caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração)

BHI pó 37g

Água Destilada 1000mL

#### 4.3.4 Meio Todd – Hewitt

Infusão de Coração 500g

Neopeptona (Difco) 20g

Bacto-dextrose 2g

Cloreto de sódio 2g

Fosfato dissódico 0,4g

Carbono de sódio 2,5g

Dissolver 30g em 1000 mL de água destilada.

### 4.4 SOLUÇÕES E REAGENTES

#### 4.4.1 Solução Salina

NaCl 8,5g

Água destilada 1000mL

#### 4.4.2 Água Peptonada

Triptona 2,5g

Peptona 2,5g

NaCl 5,0g

Água Destilada 1000mL



#### 4.4.3 DNA polimerase

A Taq DNA polimerase utilizada nas reações de amplificação foi a da marca Invitrogen, na concentração de 5U/ $\mu$ L

#### 4.4.4 dNTP

Os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) estoques (100mM), foram diluídos em água ultrapura a 2,5mM (solução de uso). Nas reações de amplificação, a concentração final utilizada foi de 0,2mM de cada dNTP.

#### 4.4.5 EDTA 0,5M

EDTA	37,22g
Água ultrapura	p/100mL
pH 8,0	

O EDTA foi pesado e acrescentou-se uma parte de água ultrapura autoclavada (aproximadamente 80% - 800mL) e o pH corrigido inicialmente com NaOH em pellet (aproximadamente 20g) e o ajuste final com NaOH (4N). Para obtenção de EDTA 50mM, diluiu-se esta solução dez vezes. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

#### 4.4.6 Gel de Agarose (0,8%)

Agarose	0,8g
Tampão TEB 1X	100mL

#### 4.4.7 Gel de Agarose (1,4%)

Agarose	1,4g
Tampão TEB 1X	100mL

#### 4.4.8 Oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*)

Os *primers* foram diluídos em tampão TE (solução 4mM) usando o peso molecular do *primer* individual dado pelo fornecedor. Os *primers* diluídos foram mantidos a -20°C.

## 4.4.9 Tampão da amostra

Sacarose	40,0g
Azul de bromofenol	0,25g
Água destilada	100mL

Os ingredientes foram solubilizados e mantidos a 4°C.

## 4.4.10 Tampão CTAB

Tris-base	2,42g
Cloreto de sódio	8,2g
Na-EDTA	0,74g
CTAB	2g
Água ultrapura	80mL
pH:7,5	

A solução foi aquecida para que o Na-EDTA e o CTAB fossem dissolvidos e o volume completado para 100mL com água Ultrapura autoclavada.

## 4.4.11 Tampão de corrida para gel de agarose (TEB 10X) – pH 8,0

Tris-base	54g
Ácido bórico	27,5g
EDTA 0,5M	20mL
Água ultrapura	p/500mL

## 4.4.12 Tampão tris-EDTA (TE)

Tris –HCl (pH: 8,0)	20mM
EDTA	20mM

## 4.4.13 Solução de Brometo de Etídio

Foram dissolvidos 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água destilada, agitando-se por várias horas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A solução foi estocada à temperatura ambiente. Para revelação, foram diluídos em 3  $\mu$ L de água destilada.

#### 4.5 ESTOQUE

Após isolamento e caracterização bioquímica, as amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus*, isoladas de amostras salivares dos indivíduos pertencentes às nove famílias, foram inoculadas em caldo BHI e incubadas por 24 horas, a 36°C. Após adição de glicerol a 40% (para cada mL de material, acrescentou-se 1mL de glicerol a 40%, resultando em uma concentração final de 20% de glicerol), as amostras foram congeladas a -80°C.

#### 4.6 CASUÍSTICA

Foram selecionadas para o estudo nove famílias, com situação homogênea de risco social (condição social e econômica semelhante), sendo que destas, três eram compostas de mãe, pai e filho(s); três contavam com mãe, pai/padrasto e filhos; e três abrangiam apenas mãe e filhos. Os critérios de inclusão utilizados foram: residir no domicílio no momento da pesquisa, não utilização de antibióticos ou antissépticos bucais por no mínimo um mês e permissão através do termo de consentimento livre e esclarecido, realizada pelo responsável pela família (Anexo I).

##### 4.6.1 Anamnese

A situação sócio-econômica e educacional das nove famílias foi investigada, levando-se em consideração a situação de trabalho dos pais, verificando-se a presença de vínculo empregatício e os anos de estudo formal dos mesmos, conforme Tabela 2.

TABELA 2 - CONDIÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA DAS FAMÍLIAS ESTUDADAS

<b>Família</b>	<b>Integrante</b>	<b>Anos de estudo</b>	<b>Situação trabalhista</b>	<b>Renda <i>per capita</i> em reais</b>
1	mãe	1	informal	100
2	mãe	4	não trabalha	40
	pai	4	formal	
3	mãe	2	não trabalha	100
	pai	4	informal	
4	mãe	4	informal	30
	pai	8	informal	
5	mãe	9	não trabalha	80
	pai	9	formal	
6	mãe	3	não trabalha	30
	pai	3	informal	
7	mãe	4	não trabalha	65
	pai	1	formal	
8	mãe	7	informal	60
9	mãe	5	informal	90

Legenda: formal – presença de vínculo empregatício

informal – sem vínculo empregatício

Os hábitos de higiene e dietéticos foram questionados intrafamiliarmente, sempre tendo como referência o núcleo familiar, onde foram verificados os padrões de consumo de dieta rica em sacarose: baixo, intermediário e alto; o aleitamento materno no momento da avaliação; e a frequência de escovação dental, segundo padrão: nunca escova, escova quase sempre, escova sempre (Tabela 3). A metodologia de coleta destes dados pode ser observada na ficha de acompanhamento domiciliar, Anexo II.

TABELA 3 -LEVANTAMENTO INTRAFAMILIAR DO CONSUMO DE SACAROSE E FREQUÊNCIA DE HIGIENE BUCAL

<b>Família</b>	<b>Alto consumo de sacarose</b>	<b>Baixo consumo de sacarose</b>	<b>Alta frequência de higiene bucal</b>	<b>Baixa frequência de higiene bucal</b>
1	Filho 1	Mãe	Filho 1	Mãe
2	Filho 3	Pai	Filho1	Filho3
3	Filho 1	Pai	Filho 1	Mãe
4	Filho1	Mãe	---	---
5	Filho1	Mãe	Filho 3	Filho1
6	Filho 3	Filho4	Filho1	Filho4
7	Pai	Mãe	Filho1	Filho2
8	Filho 3	Filho1	Filho1	Filho3
9	Filho 2	Filho1	Filho1	Filho2

Legenda: (---) ausência de escova dental no domicílio.

#### 4.6.2 Exame Clínico

A avaliação clínica foi realizada por um único examinador, em domicílio, com auxílio de espátula de madeira e luz natural, onde foi verificada presença de placa bacteriana visível nas superfícies vestibulares dos incisivos, presença de tártaro na superfície lingual de incisivos inferiores; presença de cárie ativa; contagem de dentes cariados, perdidos por cárie ou obturados, segundo índices CPO-D (para dentes permanentes) e ceo-d (para dentes decíduos) conforme casuística (Tabela 4). Outros fatores como: acesso ao serviço público de saúde e história médica, foram tão similares entre os indivíduos, que nenhuma explicação nas diferenças de transmissão e aquisição de estreptococos do grupo mutans pode ser inferida, considerando a pequena amostra populacional, apesar da condição de risco social verificada nos participantes.

TABELA 4 - CASUÍSTICA OBSERVADA NAS NOVE FAMÍLIAS, 40 INDIVÍDUOS AVALIADOS

	Paciente	Idade*	CPO-D	ceo	Placa	Cárie ativa
Família 1	M <sup>a</sup> Luíza	37	32	---	---	---
	Cláudio	13	9	---	+	sim
Família 2	Luzia	34	32	---	+++	sim
	Geraldo	51	3	---	+++	Não
	Liliane	9	0	1	+	Não
	Lílian	7	0	1	+	Não
	Jéferson	5	0	3	++	Sim
	José Denílson	44	26	---	+++	Sim
Família 3	Rosalina	35	19	---	++	Não
	Fagner	4	---	6	+	Sim
	M <sup>a</sup> Solange	38	32	---	++	Não
Família 4	Eriomal	39	6	---	++	Sim
	Iolanda	19	3	---	++	Sim
	Ricardo	14	0	---	++	Não
	Wilian	4	0	6	++	Sim
	Eduarda	1,5	0	0	++	Sim
	Marcos	24	5	---	++	Não
Família 5	Cristina	25	1	---	+++	Não
	Lucas	7	0	5	+++	Sim
	Gabriel	5	---	0	+	Não
	Luís Henrique	4	---	0	+	Não
	Josélia	32	5	---	+++	Não
Família 6	Ananias	31	3	---	+++	Não
	Jéssica	13	0	---	+	Não
	Alessandra	8	0	2	+	Não
	Alexandre	6	4	5	++	Sim
	Elisandra	4	---	6	++	Sim
	Mateus	1m**	---	---	---	--
	Vilma	42	24	---	++	Sim
Família 7	Hélio	39	26	---	+++	Não
	Camila	13	2	---	++	Não
	Jean	10	1	7	++	Sim
	Rosilene	40	28	---	+	Sim
	Inês Mayara	13	2	---	+	Não
Família 8	MaxWillian	4	---	14	++	Sim
	Deividy Felipe	11	2	---	++	Não
	Maria Izabel	40	7	---	+++	Não
	Gilson	13	2	---	++	Não
Família 9	Sabrina	4	---	0	+++	Não
	Suzana	4	---	2	++	Sim

Legenda: + pouca placa, ++ muita placa, +++ presença de tártaro ----não se aplica

\* idade em anos, \*\* idade em meses

#### 4.7 COLETAS SALIVARES

Foram realizadas cinco coletas (Tabela 5), de amostras salivares estimuladas apenas através da língua, onde o indivíduo foi orientado a excretar sua saliva dentro de um recipiente plástico esterilizado para este fim, até que o volume coletado fosse de aproximadamente 3mL. Após homogeneização no local de coleta, 100µL da saliva foi diluída em 900µL de água peptonada, transportada em recipiente térmico com gelo, e processada em até duas horas após. O procedimento de coleta foi repetido para dez indivíduos onde não foi verificado isolamento durante a primeira coleta, totalizando desta forma, 50 amostras em 40 indivíduos.

TABELA 5 -NÚMERO E PERÍODO DE COLETAS DE AMOSTRAS SALIVARES EM DOMICÍLIO

Coleta	Data	Nº de Indivíduos
1	17/8/4	8
2	13/9/4	15
3	27/9/4	18
4	18/10/4	5
5	17/11/4	4

#### 4.8 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ESTIMATIVA DE *S. mutans* e *S. sobrinus* NA SALIVA

Para o isolamento de *S. mutans*, foi realizada diluição ( $10^{-1}$ ) das amostras salivares em água peptonada, homogeneizadas em agitador magnético e 0,1mL da solução diluída foi semeada em ágar Mitis Salivarius adicionado de bacitracina (30µg/mL de meio) e telurito de potássio (0,001%), e incubada a 37°C por 48h, em microaerofilia, utilizando-se jarra de Gaspack.

Após incubação, foi realizada a estimativa das colônias de estreptococos do grupo mutans multiplicando-se o número de colônias em uma área padronizada de 1cm<sup>2</sup> pelo respectivo fator de diluição e pela área total da placa.

Em seguida foram isoladas as colônias selecionadas pela morfologia característica de *S. mutans* e após a purificação, análise morfológica pelo método de Gram e provas bioquímicas foram realizadas e os isolados estocados a -70°C.

#### 4.8.1 Provas Bioquímicas para Identificação de *S. mutans*

A caracterização bioquímica de *S. mutans* seguiu os resultados das provas recomendadas para esta espécie apresentadas na Tabela 6.

TABELA 6 -CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DAS ESPÉCIES DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS, BASEADO EM PROVAS BIOQUÍMICAS E DE SENSIBILIDADE À BACITRACINA

Provas	<i>S.mutans</i>	<i>S.rattus</i>	<i>S.cricetus</i>	<i>S.sobrinus</i>	<i>S.ferus</i>	<i>S.macacae</i>	<i>S.downei</i>
Sorotipos	c/e/f	b	A	d/g	E	E	h
Fermentação de							
Manitol	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	-	+	-
Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	+	-	-	-
Hidrólise de Arginina	-	+	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	d	d	+	+	-
Resistência a Bacitracina	+	+	-	+	-	-	-

(\*) Algumas linhagens podem dar resultados negativos; (\*\*) algumas linhagens podem dar resultado positivo; d 11-89% das linhagens são positivas.

Adaptado de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

##### 4.8.1.1 Prova da Catalase

A prova foi realizada colocando-se água oxigenada 3% sobre colônias características crescidas no AMSB, observando-se a formação de bolhas de gás (prova positiva).



#### 4.8.1.2 Prova da fermentação do Sorbitol e Manitol

Foi adicionado 0,1mL de cultura pura, cultivada em meio base caldo BHI (Newprov), em um meio contendo manitol ou sorbitol e indicador de pH (púrpura de bromocresol). Os meios foram incubados a 37°C por 48 horas. A prova foi considerada positiva quando ocorreu a mudança da cor do indicador de pH do meio, de roxo para amarelo.

#### 4.8.1.3 Prova da Hidrólise da Esculina

Foi semeado 0,1mL de cultura pura em Ágar Esculina Inclinado. Após incubação a 37°C por 48 h o desenvolvimento de coloração negra determinou a positividade da prova.

#### 4.8.1.4 Prova da Hidrólise da Arginina

Foi adicionado 0,1mL de cultura pura do microrganismo em meio base caldo BHI, contendo arginina e indicador de pH (púrpura de bromocresol). O tubo inoculado foi vedado com óleo mineral e incubado a 37°C por 48 horas. Inicialmente, a cor do meio altera para amarelo devido à acidificação pela fermentação da glicose presente no meio. Se a arginina é descarboxilada, pela presença da enzima dihidrolase, um produto final alcalino reverte o indicador para coloração púrpura, indicando a reação positiva.

### 4.9 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com VICENTE (2000) modificado. As amostras foram previamente inoculadas em caldo BHI (*Brain heart infusion*) e incubadas por 24h a 36°C. Após este período as culturas foram centrifugadas a 49000 x g por 2 min e o sedimento transferido a um tubo contendo uma mistura de sílica em pó (sílica gel Merck) e celite 2:1, em 600µL de CTAB. Em seguida foram aplicados três pulsos (de 30 seg) de ultra-som (potência 70), com intervalos de 30 seg entre cada pulso, sob banho de gelo, utilizando desruptor de célula ultrassônico (marca Unique).

Foram, então, adicionados 400 µL de CTAB e as amostras incubadas em banho-maria a 65°C por 10 min. Após atingir temperatura ambiente, foram adicionados 1000 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA) e os tubos centrifugados a 49000 x g por 7 min. O sobrenadante foi transferido a outro tubo, ao qual foram adicionados mais 1000 µL de CIA e a centrifugação repetida. Cerca de 2000 µL de álcool 96% gelado foram adicionados ao sobrenadante e os tubos incubados a -20°C por 30 min para precipitação dos ácidos nucleicos, e após este período foram centrifugados a 49000 x g por 7 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com álcool 70% gelado e repetida a centrifugação a 49000 x g por 7 min. O álcool foi retirado e os tubos vertidos em fluxo laminar até a secagem completa do precipitado. Posteriormente, foram adicionados 50µL de água ultrapura para ressuspender o DNA. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 24h e armazenados a -4°C. A integridade foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 0,8%, e visualizada com brometo de etídio em UV.

#### 4.10 VARIABILIDADE GENÉTICA

##### 4.10.1 Amplificação do DNA por RAPD

Para a amplificação do DNA, foram utilizadas as condições descritas por PEREIRA et al. (2002), modificado, utilizando uma mistura contendo, além da amostra de DNA, os seguintes elementos: 1,5 unidades de *Taq* DNA polimerase, 0,4 mM para cada dNTP, 4,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 0,4 mM de *primer*, 10 mM de tampão da enzima 1X e 12 ng de DNA por 15 µL de reação.

As condições de amplificação foram realizadas de acordo com SPOLIDORIO et al. (2003), modificado. Foram utilizados 40 ciclos com as seguintes condições: 30s a 94°C; 30s a 36°C e 1 min a 72°C. Foram utilizados 5 min a 94°C para desnaturação inicial e 3 min a 72°C de extensão final.

Os oligonucleotídeos utilizados foram da linha Operon Technologies e suas respectivas seqüências podem ser visualizadas na Tabela 7.

TABELA 7 - SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTIDEOS INICIADORES

<i>Primer</i>	<i>Seqüência</i>
OPA -13	5'CAGCACCCAC 3'
OPA - 07	5'AAAACGGGTG 3'
OPA - 09	5' GGGTAACGCC 3'
OPA - 02	5' TGCCGAGCTG 3'
OPA - 05	5'AGGGGTCTTG 3'

Fonte: Operon Technologies®.

#### 4.10.2 Eletroforese

Os produtos resultantes da amplificação por RAPD foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,4%, submetidos à corrida eletroforética realizada sob voltagem constante de 3V/cm. O padrão de peso molecular utilizado foi o de 100 pb (DNA *Ladder* 100 pb, Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL (10 min) e as bandas observadas com auxílio de um transluminador de luz ultravioleta.

#### 4.10.3 Análise da Variabilidade Genética

Para a análise do polimorfismo gerado pelos marcadores RAPD, foi utilizado o *software* NTSYS (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*) de acordo com os princípios adotados em taxonomia numérica (ROHLF, 1988).

As bandas resultantes da amplificação foram analisadas com base em variáveis binárias, onde 0 indica ausência de banda e 1 presença. Utilizando o *software* NTSYS, a partir da matriz binária obtida, foi construída uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard (J). Este coeficiente permite calcular similaridades com base em variáveis binárias. As bandas foram consideradas como variáveis enquanto as linhagens como unidades. O coeficiente foi calculado segundo a fórmula  $J=M/P$ , onde M é o número de concordâncias positivas, e P o número total de variáveis, menos as concordâncias negativas (SNEATH & SOKAL, 1973).

A partir da matriz de similaridade, as unidades foram agrupadas através do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), para a construção dos dendrogramas. A confiabilidade dos grupamentos foi verificada pela análise *bootstrap* com 10000 reamostragens, segundo descrito por FELSENSTEIN (1985), utilizando o *software* Bood 3.03 (COELHO, 2005). Foram considerados consistentes os agrupamentos que apresentaram P maior ou igual a 95%, sendo P a frequência de determinado agrupamento no conjunto dos dendrogramas resultantes das repetições *bootstrap*. Para o estudo foram utilizadas 64 amostras das nove famílias, a linhagem referência ATCC 25175 de *S. mutans*, dez linhagens isoladas destas famílias e caracterizadas bioquimicamente como *S. sobrinus* e duas linhagens de *S. pyogenes*, isoladas de um surto de faringite ocorrido em Curitiba; totalizando assim 77 amostras. A análise de variância dos marcadores RAPD foi realizada utilizando o programa Arlequin (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000).

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise multivariada foi utilizada visando descrever a estrutura de dependência entre as variáveis de interesse, que neste trabalho, foi composto por variáveis qualitativas: a) mãe, pai ou filho com integrante familiar; b) 1,2 ou 3 isolados de *S. mutans*, caracterizado morfológicamente em AMSB e bioquimicamente; c) 1 isolado de *S. sobrinus* caracterizado morfológicamente em AMSB e bioquimicamente; d) ausência de placa bacteriana dental visível em exame domiciliar, com placa bacteriana dental visível ou presença de tártaro dental ao exame domiciliar; e) baixo consumo de sacarose, consumo moderado de sacarose ou alto consumo de sacarose; f) e cárie ativa presente ao exame domiciliar.

E por variáveis quantitativas: a) idade dos indivíduos integrantes das famílias; b) número de dentes afetados por cárie, sendo calculada a somatória de CPO-D e ceo-d; c) quantitativo de UFC/mL de saliva; d) número de colônias do grupo *mutans* segundo morfologia de colônia, crescida em ágar Mitis Salivarius; e) número de anos de estudo da mãe e do pai; f) renda *per capita* mensal dos integrantes da família.

Os dados originais qualitativos foram então codificados através de variáveis indicadoras (dados binários: 1 para presença e 0 para ausência), e os dados quantitativos foram padronizados através da fórmula  $W=(X-\min(X))/(\max(X)-\min(X))$ , sendo W o valor padronizado, X(min) o menor valor registrado para aquela variável, max(X) o maior valor registrado e X o valor original do dado (HAIR et al., 1998).

A análise dos componentes principais, que descrevem a estrutura de correlação das variáveis, foi utilizada na análise fatorial. Deste modo, criou-se um grupo menor de variáveis (chamados fatores), que respondem pela maior parte da variância das variáveis originais. Através da propriedade de fatores, que visam explicar uma determinada porcentagem da variabilidade total dos dados originais, foram utilizados todos os fatores que explicaram, conjuntamente, mais de 70% da variabilidade total e apresentaram autovalores superiores a um. Para maximizar as correlações de cada variável, aplicou-se a rotação varimax, sendo destacadas aquelas variáveis que colaboraram com valores acima de 0,7 (KAISER, 1958). Como cada fator agrupa variáveis mais fortemente relacionadas entre si, eles foram nomeados individualmente e relacionados em gráficos biplot (GABRIEL, 1971) para identificar a relação dessas variáveis. A interpretação foi feita através da análise da magnitude de cada coeficiente em relação ao vetor nulo (intersecção dos dois eixos), sendo que, quanto mais distante dessa intersecção maior a contribuição da variável para a variância total, e a aproximação estatística, menor distância euclidiana entre variáveis caracterizaram-se como forte relação entre si (LAVORANTI, 2003).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE *S. mutans*

A partir do isolamento em AMSB, as colônias características de *S. mutans* foram identificadas como: puntiformes, pequenas, médias e grandes. Com estes critérios, foram isoladas 157 colônias a partir das amostras salivares dos 40 integrantes das nove famílias, obtendo-se uma média de quatro colônias por indivíduo, de diferentes morfologias. Em 25% dos indivíduos foi realizada a segunda coleta, quando na primeira não foi possível caracterizar bioquimicamente a bactéria *S. mutans*. Nas 157 colônias isoladas, um percentual de 40,7% (n=64) foi positivo para *S. mutans*.

Resultados semelhantes foram observados por YOO, et al. (2005), utilizando o meio ágar Mitis Salivarius acrescido de bacitracina, para isolar microrganismos. De um total de 21 colônias típicas analisadas, 12 não pertenciam ao grupo mutans, sendo identificadas por provas bioquímicas e moleculares como *S. anginosus*, *S. sanguis* e *Pantoea agglomerans*. Desta forma, os resultados sugerem a necessidade de padronização de critérios associados ao meio seletivo para isolamento dos estreptococos do grupo mutans.

EMILSON (1983) identificou duas morfologias distintas de isolados de *S. mutans* em ágar Mitis Salivarius com bacitracina, sendo a primeira associada aos sorotipos c/e/f, tendo aparência de vidro estilhaçado; e a segunda de consistência mais cremosa e superfície granular, associada aos sorotipos d/g. De acordo com observações referentes ao isolamento de *S. mutans*, BARBIERI (2005) relatou que a morfologia colonial entre os isolados foi bastante diferenciada, indicando assim a necessidade de selecionar para as provas bioquímicas não somente as colônias com a mesma característica morfológica, e sim com as várias morfologias encontradas.

A partir da caracterização bioquímica dos isolados, verificou-se para cada indivíduo das nove famílias analisadas, o isolamento de uma a três colônias positivas bioquimicamente para *S. mutans*. Além destas, dez colônias caracterizaram-se bioquimicamente como *S. sobrinus* e foram estocadas para utilização como possível controle negativo.

Dentro do critério de leitura adotado, observou-se que somente 10% das placas tinham exclusivamente colônias com morfologia puntiforme, porém esta morfologia foi a mais freqüente entre as amostras observadas, seguida por colônias pequenas. Colônias grandes foram menos prevalentes, estando ausente em 34 placas, ou seja, 85%.

Na Tabela 8 foram apresentadas as morfologias das colônias observadas em placa com AMSB, e o valor total de cada padrão observado, baseado na estimativa das UFC/mL.

TABELA 8 -PADRÃO DE ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS SALIVARES SEGUNDO O CRITÉRIO DE LEITURA ADOTADO

	Indivíduo	Idade*	Morfologia das colônias segundo critério de leitura adotado	UFC/mL de saliva
Família 1	mãe	37	Predomínio de colônias pequenas, médias e algumas grandes.	2000
	filho	13	Algumas pequenas, predomínio de médias e grandes	9000
Família 2	mãe	34	Predomínio de colônias pequenas, algumas puntiformes.	10000
	pai	51	Poucas colônias médias	400
	filha	9	Colônias pequenas, médias e predomínio de puntiforme.	10000
	filha	7	Colônias médias, puntiformes e predomínio de pequenas.	10000
	filho	5	Colônias pequenas e médias, com predomínio de puntiforme.	10000
Família 3	pai	44	Colônias pequenas, médias e predomínio de puntiformes.	10000
	mãe	35	Poucas colônias pequenas, predomínio de médias.	1000
	filho	4	Colônias médias e pequenas	2000
Família 4	mãe	38	Colônias pequenas e médias.	2000
	pai	39	Poucas colônias pequenas e grandes.	100
	filha	19	Algumas colônias pequenas e médias, predomínio de puntiforme.	2000
	filho	14	Predomínio de colônias pequenas, algumas médias e puntiformes.	300
	filho	4	Presença de colônias pequenas e médias.	2000
	neta	1,5	Apresentou colônias pequenas e médias,	2000
Família 5	pai	24	Apenas colônias pequenas.	100
	mãe	25	Apenas colônias puntiformes.	10000
	filho	7	Colônias exclusivamente puntiformes.	10000
	filho	5	Colônias todas pequenas.	800
	filho	4	Colônias pequenas, médias e puntiformes.	7000

Continuação

	Indivíduo	Idade*	Morfologia das colônias segundo critério de leitura adotado	UFC/mL de saliva
Família 6	mãe	32	Colônias pequenas, médias e grandes, com predomínio das últimas.	6000
	pai	31	Predomínio de colônias pequenas, com algumas médias e puntiformes.	10000
	filha	13	Colônias pequenas, médias e predomínio de puntiforme.	10000
	filha	8	Colônias pequenas, médias e predomínio de puntiforme,	10000
	filho	6	Colônias pequenas, médias e predomínio de puntiforme.	20000
	filha	4	Colônias pequenas, médias e algumas grandes.e puntiformes.	2000
	filho	1m**	Colônia média.	10
Família 7	mãe	42	Colônias pequenas, médias e puntiformes.	4000
	pai	39	Apenas colônias puntiformes.	10000
	filha	13	Predomínio de colônias médias, com algumas pequenas e puntiformes.	4000
	filho	10	Colônias pequenas, médias e puntiformes.	20000
Família 8	mãe	40	Apenas colônias puntiformes	10000
	filha	13	Colônias médias.	1000
	filho	4	Presença de colônias pequenas e médias.	2000
	filho	11	Apenas colônias puntiformes	100
Família 9	mãe	40	Colônias pequenas médias e puntiformes.	7000
	filho	13	Apenas colônias puntiformes	1000
	filha	4	Colônias pequenas médias e puntiformes	10000
	filha	4	Colônias pequenas e médias.	1000

Legenda: \* idade em anos, \*\* idade em meses.

CAUFIELD, et al. (1988), encontraram correlação significativa entre o nível de estreptococos do grupo mutans na saliva de mães e filhos. De forma similar, nas famílias analisadas neste estudo, de acordo com a Tabela 8 pode-se observar que para a grande parte das mães verificou-se concordância na estimativa de UFC/mL de saliva, com pelo menos um de seus filhos e proporcionalmente, considerando todos os filhos, houveram mais concordâncias que discordâncias.

Segundo ANTONY e MUNSHI (1997), os resultados obtidos pela estimativa de colônias presentes em amostras salivares, podem ser graduados conforme: alta contagem (superior a  $10^5$  UFC/mL), intermediária (entre  $10^3$  e  $10^5$ ), e baixa contagem (inferior a  $10^2$ ). De acordo com os autores citados, entre os 40 indivíduos, algumas contagens seriam baixas e muitas seriam intermediárias.

Ainda com relação ao isolamento de estreptococos do grupo mutans em ágar Mitis Salivarius, houve semelhança entre as morfologias observadas no meio de cultura, nas famílias indicadas na Tabela 9.



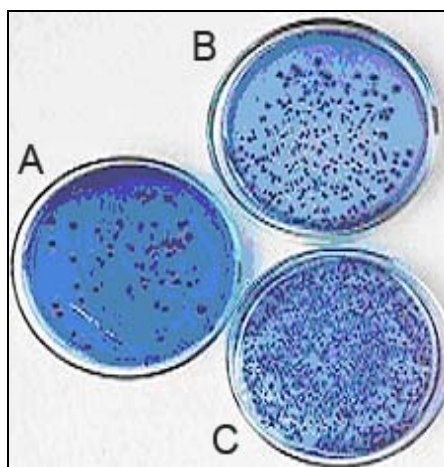
TABELA 9 - AGRUPAMENTO DE INDIVÍDUOS SEGUNDO A FAMÍLIA DE ORIGEM. VERIFICADO DE ACORDO COM O PADRÃO DE ISOLAMENTO NAS AMOSTRAS SALIVARES

Família	Indivíduos
2	irmãos
4	mãe, filha mais velha, terceiro filho e neta
5	mãe e filho mais velho, pai e segundo filho
6	irmãos
7	mãe e filho mais novo
8	mãe e filho
9	mãe e uma das filhas gêmea

#### 5.1.1 Estimativa das UFC/mL de saliva cultivada

A contagem foi realizada por amostragem, baseada nas UFC/mL de saliva cultivada, multiplicando-se o número de colônias presentes em uma área padronizada de  $1 \text{ cm}^2$  da placa por  $\pi \times (\text{raio da placa})^2$  e pelo fator de diluição, sendo verificada uma variação de 10 a 10.000 UFC/mL de saliva, com média de 8.000 Unidades Formadoras de Colônia nas famílias avaliadas (Tabela 7 e Figura 2). A concentração de *S. mutans* na saliva humana apresenta variações desde não detectável até  $10^7$  UFC/mL, com concentração média de  $10^5$  UFC/mL de saliva. PIMENTA (2001), pesquisando 93 pessoas de seis famílias brasileiras, relatou uma variação de 300 a  $1,6 \cdot 10^8$  UFC/mL de saliva.

FIGURA 2 - DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE UFC/mL DE SALIVA, OBSERVADO EM ÁGAR MITIS SALIVARIUS



Legenda: A - padrão de isolamento correspondente a 0 – 1.000 UFC/ml de saliva;  
 B - padrão de isolamento correspondente a 1.000 – 10.000 UFC/ml de saliva;  
 C - padrão de isolamento correspondente a acima de 10.000 UFC/ml de saliva.  
 Fonte: O autor.

De acordo com a macromorfologia das colônias, entre os isolados de *S. mutans* predominou a morfologia de colônia média, com 39%. Nos isolados de *S. sobrinus*, não foi reconhecida a morfologia puntiforme. O total de isolados nesta pesquisa foi 74, sendo 64 de *S. mutans* (86,5%) e dez de *S. sobrinus* (13,5%) provenientes das nove famílias, envolvendo 40 pessoas avaliadas (Tabela 10). Verificou-se assim, que 31 pessoas (77%) estavam monocolonizadas por *S. mutans* e nove indivíduos (23%), multicolonizados por *S. sobrinus* e *S. mutans*.

TABELA 10 - ISOLADOS INTRAFAMILIAR DE *S. mutans* E *S. sobrinus*, IDENTIFICADOS SEGUNDO MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIA, E BIOQUIMISMO

Família	Isolado	Caracterização bioquímica	Outras nomenclaturas*	Macromorfologia**	Origem
Família 1	1	<i>S. mutans</i>	1M	P	Mãe
	2	<i>S. mutans</i>	2M	M	Mãe
	3	<i>S. mutans</i>	9M	M	Filho
	4	<i>S. mutans</i>	10M	G	Filho
Família 2	5	<i>S. mutans</i>	3M	P	Mãe
	6	<i>S. mutans</i>	1pe	P	Pai
	7	<i>S. mutans</i>	2pu	Pu	Filho1
	8	<i>S. mutans</i>	2pe	P	Filho1
	9	<i>S. mutans</i>	2g	G	Filho1
	10	<i>S. mutans</i>	3pu	Pu	Filho2
	11	<i>S. mutans</i>	3pe	P	Filho2
	12	<i>S. mutans</i>	4pe	P	Filho3
	13	<i>S. mutans</i>	39pu	Pu	Pai
Família 3	14	<i>S. mutans</i>	39pe	P	Pai
	15	<i>S. mutans</i>	4M	M	Mãe
	16	<i>S. mutans</i>	19me	M	Filho1
	70	<i>S. sobrinus</i>	39me	M	Pai
	71	<i>S. sobrinus</i>	39gr	G	Pai
	66	<i>S. sobrinus</i>	19gr	G	Filho1
	17	<i>S. mutans</i>	8me	M	Mãe
	18	<i>S. mutans</i>	7pe	P	Pai
	19	<i>S. mutans</i>	7gg	G	Pai
Família 4	20	<i>S. mutans</i>	9pu	Pu	Filho1
	21	<i>S. mutans</i>	9me	M	Filho1
	22	<i>S. mutans</i>	12M	P	Filho2
	23	<i>S. mutans</i>	13M	Pu	Filho2
	24	<i>S. mutans</i>	10me	M	Filho3
	25	<i>S. mutans</i>	48me	M	Neta
	26	<i>S. mutans</i>	48pe	P	Neta
	27	<i>S. mutans</i>	11M	M	Pai
	28	<i>S. mutans</i>	20me	M	Mãe
Família 5	29	<i>S. mutans</i>	20gr	G	Mãe
	30	<i>S. mutans</i>	21pe	P	Filho1
	31	<i>S. mutans</i>	21me	M	Filho1
	32	<i>S. mutans</i>	21gr	G	Filho1
	33	<i>S. mutans</i>	22me	M	Filho2
	34	<i>S. mutans</i>	22gr	G	Filho2
	35	<i>S. mutans</i>	22pe	P	Filho2
	36	<i>S. mutans</i>	14me	M	Filho3
	37	<i>S. mutans</i>	14gr	G	Filho3

## Continuação

Família	Isolado	Caracterização bioquímica	Outras nomenclaturas*	Macromorfologia**	Origem
Família 6	38	<i>S. mutans</i>	5M	G	Mãe
	39	<i>S. mutans</i>	15pe	P	Pai
	40	<i>S. mutans</i>	15me	M	Pai
	41	<i>S. mutans</i>	16pu	Pu	Filho1
	42	<i>S. mutans</i>	16pe	P	Filho1
	43	<i>S. mutans</i>	17me	M	Filho2
	44	<i>S. mutans</i>	18pu	Pu	Filho3
	45	<i>S. mutans</i>	18me	M	Filho3
	46	<i>S. mutans</i>	6M	P	Filho4
	47	<i>S. mutans</i>	7M	M	Filho4
	48	<i>S. mutans</i>	8M	G	Filho4
	49	<i>S. mutans</i>	26me	M	Filho5
Família 7	50	<i>S. mutans</i>	23pe	P	Mãe
	51	<i>S. mutans</i>	43pu	Pu	Pai
	52	<i>S. mutans</i>	24pe	P	Filho1
	53	<i>S. mutans</i>	25me	M	Filho2
	54	<i>S. mutans</i>	25pu	Pu	Filho2
	74	<i>S. sobrinus</i>	42me	M	Mãe
	75	<i>S. sobrinus</i>	43pe	P	Pai
	67	<i>S. sobrinus</i>	25pe	P	Filho2
Família 8	59	<i>S. mutans</i>	47me	M	Mãe
	55	<i>S. mutans</i>	33m2 <sup>a</sup>	M	Filho1
	56	<i>S. mutans</i>	34pe	P	Filho2
	57	<i>S. mutans</i>	34me	M	Filho2
	58	<i>S. mutans</i>	35pu	Pu	Filho3
	72	<i>S. sobrinus</i>	47pe	P	Mãe
	68	<i>S. sobrinus</i>	33p2 <sup>a</sup>	P	Filho1
Família 9	61	<i>S. mutans</i>	50pu	Pu	Mãe
	62	<i>S. mutans</i>	50me	M	Mãe
	60	<i>S. mutans</i>	36 me	M	Filho1
	63	<i>S. mutans</i>	52me	M	Filho2
	64	<i>S. mutans</i>	53gr	G	Filho3
	73	<i>S. sobrinus</i>	50gr	G	Mãe
	69	<i>S. sobrinus</i>	36gr	G	Filho1

Legenda: \* Nomenclatura inicial utilizada por procedência da linhagem.

\*\* P: pequena; M: média; G: grande; Pu: puntiforme, segundo critério de leitura adotado.

Resultado semelhante foi observado por PIMENTA (2001), onde 63% dos indivíduos de seis famílias estavam monocolonizados, 34% multicolonizados e 3% colonizados apenas por *S. sobrinus*.

HIRASAWA e TAKADA (2003) relataram a coexistência de 22% de *S. mutans* e *S. sobrinus*, e nestes sujeitos os *S. mutans* eram mais abundantes e em maior variedade. Porém, AZEVEDO et al. (1988), verificaram que aproximadamente 50% dos pares: mãe e filho analisados estavam monocolonizadas por *S. mutans* e outros 50% por *S. mutans* e *S. sobrinus*.

Entretanto, nos 40 indivíduos analisados, a partir do isolamento realizado, o *S. mutans* foi freqüentemente encontrado isoladamente, enquanto que o *S. sobrinus* foi detectado, na maioria das vezes, em indivíduos que abrigavam o *S. mutans*. Resultados semelhantes têm sido relatados pela literatura (KÖHLER, et al., 1988; BABAAHMADY et al., 1998; LINDQUIST & EMILSON, 1991).

Segundo GIBBONS, (1984), a colonização por *S. sobrinus* é mais dependente da sacarose que quando realizada por *S. mutans*. Porém, dos 40 indivíduos avaliados neste estudo, nove apresentaram *S. sobrinus*, estavam multicolonizados e entre eles apenas 3 (33%) relataram alto consumo diário de sacarose.

## 5.5 ANÁLISE DA ESTATÍSTICA MULTIVARIADA

Os dados de isolamento e caracterização bioquímica foram relacionados com a casuística, situação sócio-econômica e educacional, hábitos dietéticos e de higienização bucal, através da matriz de coeficientes de correlação (Tabela 1 do Anexo III).

Observaram-se efeitos e significativos, a 5% de probabilidade, e positivos entre: idade e integrante familiar mãe e pai, número de dentes atingidos por cárie (CPO-D mais ceo-d), presença de tártaro visível ao exame e baixo consumo de sacarose. Sendo a cárie uma doença microbiana que aumenta sua prevalência com a idade, assim como a doença periodontal, a epidemiologia das doenças foi de acordo com o esperado. O baixo consumo de sacarose por parte dos pais ocorreu uma vez que comparativamente, nas famílias os maiores consumidores eram os filhos.

Da mesma forma, observou-se relação significativa e positiva entre: mãe como integrante da família, número de dentes atingidos (CPO-D) e número de anos de estudo formal. O maior conhecimento não refletiu necessariamente em atitudes e comportamento.

O consumo moderado de sacarose e a presença de tártaro e escolaridade dos pais também tiveram relação positiva. A maior escolaridade não contribuiu para uma melhor condição de higiene bucal, porém definiu um consumo mais equilibrado de sacarose.

Houve associação positiva com presença de cárie ativa e acúmulo de placa bacteriana visível, bem como cárie ativa com alto consumo de sacarose. Segundo NEWBRUN (1988), a dieta desempenha um papel central no desenvolvimento da cárie. Observações têm mostrado claramente a relação entre consumo freqüente de carboidratos fermentáveis e alta atividade cariogênica. Estudos realizados por AXELSSON et al. (1976), demonstraram que cáries podem ser prevenidas através de escovação dental regular, pela remoção efetiva da placa bacteriana.

O baixo consumo de sacarose entre os integrantes da família e número de anos de estudo formal dos pais, também estiveram correlacionados positivamente. O fator escolaridade influenciou no determinante importante da doença, que é a dieta cariogênica.

Verificando a estimativa de UFC/mL de saliva e morfologia puntiforme das colônias crescidas em AMSB, diferente de SOUZA (1992), os indivíduos com alta contagem de *S. mutans* na saliva, não apresentaram significativamente maior atividade de cárie. Porém de acordo com NIE et al. (2002), a contagem de *S. mutans* não tem correlação significativa com a experiência de cárie em indivíduos adultos, havendo variação dos níveis salivares deste microrganismo. No presente estudo observou-se que a alta contagem de UFC/mL de saliva foi relacionada com a morfologia de colônia puntiforme, de aspecto de vidro estilhaçado.

A renda *per capita* mensal, apesar de ter variação de 30 a 100 reais (Tabela 2), não apresentou variância significativa para explicar a epidemiologia da cárie nestas famílias estudadas.

Não foram observados valores muitos altos para os coeficientes de correlação, o que de certo modo foi muito útil para a análise de componentes principais, evitando assim os efeitos da multicolinearidade, e desse modo, todas as variáveis foram selecionadas para a primeira análise de fatores.

Na primeira análise observou-se que oito componentes principais apresentaram autovalores superiores a um e juntos acumularam 79,28% da explicação da variância total, esses componentes foram utilizados para as análises de fatores (Tabela 2 do Anexo III). Nesta análise, as variáveis: presença de um isolado de *S. sobrinus*, ausência de placa bacteriana dental visível ao exame domiciliar, número de UFC/mL de saliva e renda mensal *per capita* apresentaram baixas comunalidades (inferiores a 0,7), e foram excluídas.

Na segunda análise observou-se que sete componentes principais apresentaram autovalores superiores a um e juntos acumularam 84,12% da variância total, esses componentes foram utilizados para as análises de fatores. Nesta análise, a variável placa bacteriana dental visível ao exame domiciliar apresentou baixa comunalidade ( $h^2 = 0,6481$ ) e foi excluída da análise.

Na terceira análise observou-se que sete componentes principais apresentaram autovalores superiores a um e juntos acumularam 86,40% da variância total, esses componentes foram utilizados para as análises de fatores. Nesta análise, a variável presença de tártaro visível ao exame domiciliar apresentou baixa comunalidade ( $h^2 = 0,6921$ ) e foi excluída da análise. Finalmente, observou-se que sete componentes principais apresentaram autovalores superiores a um e juntos acumularam 88,36% da variância total, disto decorre que selecionando apenas sete componentes, perdia-se 11,64% da variância total (Tabela 11).

TABELA 11 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E COMUNALIDADE DAS VARIÁVEIS

Componente	Autovalor	Porcentagem da variância	Porcentagem acumulada	Variável	Comunalidade
1	<b>4.3464</b>	<b>27.16</b>	<b>27.16</b>	idade	0.8970
2	<b>2.0554</b>	<b>12.85</b>	<b>40.01</b>	Mãe	0.9216
3	<b>1.9653</b>	<b>12.28</b>	<b>52.29</b>	Pai	0.8978
4	<b>1.7559</b>	<b>10.97</b>	<b>63.27</b>	Filho	0.9593
5	<b>1.5002</b>	<b>9.38</b>	<b>72.65</b>	1 isolados de <i>s. mutans</i>	0.9927
6	<b>1.4096</b>	<b>8.81</b>	<b>81.46</b>	2 isolados de <i>s. mutans</i>	0.9916
7	<b>1.1054</b>	<b>6.91</b>	<b>88.36</b>	3 isolados de <i>s. mutans</i>	0.9544
8	0.6359	3.97	92.34	nº dentes atingidos	0.7498
9	0.4660	2.91	95.25	baixo consumo de sacarose	0.9011
10	0.3311	2.07	97.32	moderado c. de sacarose	0.9544
11	0.2647	1.65	98.97	alto consumo de sacarose	0.9162
12	0.1269	0.79	99.77	morfologia média	0.8534
13	0.0372	0.23	100.00	morfologia grande	0.7528
14	0.0000	0.00	100.00	morfologia puntiforme	0.8040
15	0.0000	0.00	100.00	presença de cárie ativa	0.8176
16	0.0000	0.00	100.00	anos de estudo dos pais	0.7745

Após a rotação dos eixos, pela rotação VARIMAX, a dominância dos fatores pelas variáveis foi apresentada na Tabela 12.

TABELA 12 - MATRIZ DOS FATORES ROTACIONADOS

Variável	Fatores						
	1	2	3	4	5	6	7
Mãe	<b>0.8874</b>	-0.0630	-0.0703	-0.3472	0.0545	-0.0373	-0.0173
Idade	<b>0.8497</b>	-0.1837	-0.0110	0.3402	-0.0680	0.0406	-0.1380
Nº de dentes atingidos	<b>0.7835</b>	0.2242	-0.0798	-0.1131	-0.1957	0.1361	-0.0978
Anos de estudo dos pais	<b>0.7205</b>	-0.1428	0.0340	0.4825	0.0078	0.0317	0.0030
Filho	<b>-0.8885</b>	0.1343	0.0339	-0.3701	0.0593	0.0318	0.0957
Cárie ativa	0.0903	<b>0.8717</b>	0.0593	-0.1499	0.1297	0.0108	0.0812
Alto consumo de sacarose	-0.3278	<b>0.8437</b>	-0.0462	0.0302	-0.2761	0.0857	-0.1017
2 isolados de <i>S. mutans</i>	-0.0025	0.0133	<b>0.9561</b>	0.0482	0.0015	0.0188	-0.2731
1 isolado de <i>S. mutans</i>	0.1153	-0.0113	<b>-0.9395</b>	-0.0019	0.0231	-0.0629	-0.3035
Pai	0.1669	-0.1085	0.0363	<b>0.9078</b>	-0.1441	0.0005	-0.1095
Consumo moderado de sac.	-0.0093	-0.3755	0.0225	-0.1246	<b>0.8906</b>	0.0625	-0.0144
Baixo consumo de sacarose	0.3385	-0.4101	0.0202	0.1137	<b>-0.7524</b>	-0.1579	0.1183
Morfologia puntiforme	0.0575	0.1130	-0.0024	-0.0587	0.0629	<b>0.8830</b>	0.0285
Morfologia grande	0.0304	0.2018	-0.1415	0.3030	0.4980	-0.5645	0.1811
Morfologia média	-0.0575	-0.0283	-0.0651	-0.4931	-0.1867	<b>-0.7252</b>	-0.2027
3 isolados de <i>S. mutans</i>	-0.1882	-0.0030	0.0045	-0.0756	-0.0410	0.0742	<b>0.9519</b>

O fator 1 foi dominado pelas variáveis mãe e filho como integrante familiar, idade, número de dentes atingidos, número de anos de estudo formal dos pais, e assim foi denominado como Padrão Familiar de Distribuição da Doença, uma vez que agrupou os componentes familiares mãe e filho, com história da doença cárie nestes indivíduos e grau de instrução. Esse fator explicou 27,16% da variância total, ressaltando-se como o mais importante fator para avaliação epidemiológica da doença cárie em famílias de baixa renda.

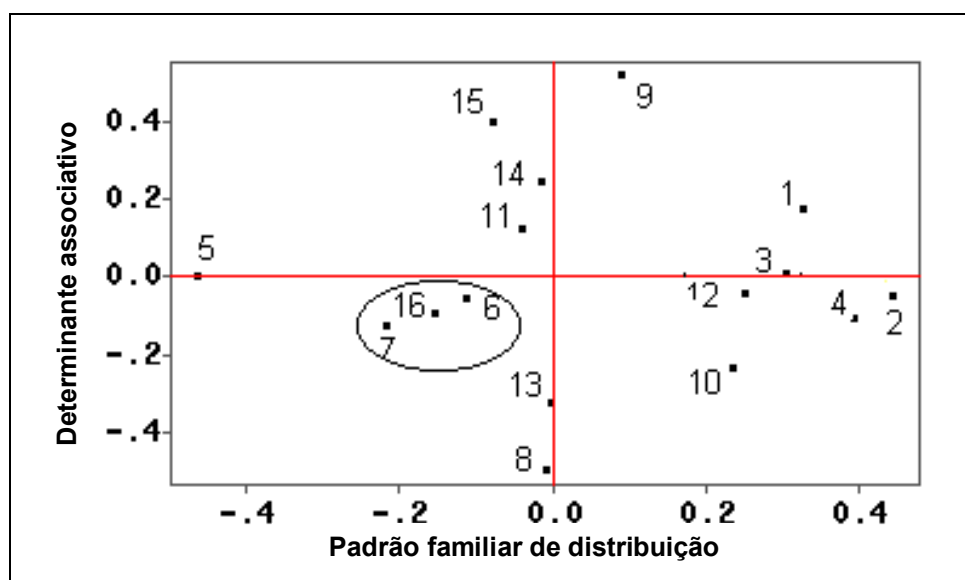
O fator 2 foi dominado pelas variáveis presença de cárie ativa e alto consumo de sacarose, e interpretado como Fator Determinante Associativo da Doença, associando o alto consumo de sacarose na determinação da atividade de doença nestas famílias, respondendo por 12,85% da variância total, sendo assim, o segundo fator mais importante na análise.

Fatores ambientais como exposição à sacarose na dieta modulam a severidade da doença. (LI et al., 2000). Observou-se em estudo, a freqüente ingestão de sacarose pelas crianças, o que facilita a implantação e proliferação de *S. mutans*, levando rapidamente ao processo cariioso (CAULFIELD, et al., 1993; PACKER, et al., 1999; BALAKRISHNAN, et al., 2000).

EMILSON et al. (1987), sugeriram que abaixa atividade de cárie em uma população não estaria relacionada apenas colonização por linhagens de *S. mutans* de baixa virulência, mas fatores como dieta, estariam associados.

As relações entre as variáveis associadas a esses dois primeiros fatores, observadas através dos escores dos componentes principais (Figura 3), revelaram uma associação forte entre presença de cárie ativa e alto consumo de sacarose e três isolados de *S. mutans* por indivíduo.

FIGURA 3 - BIPLLOT DOS COMPONENTES PRINCIPAIS 1 E 2



Códigos: 1: mãe; 2: idade; 3: nº de dentes atingidos; 4: anos de estudo dos pais; 5: filho; 6: cárie ativa; 7: alto consumo de sacarose; 8: 2 isolados de *S. mutans*; 9: 1 isolado de *S. mutans*; 10: pai; 11: consumo moderado de sacarose; 12: baixo consumo de sacarose; 13: morfologia de colônia puntiforme; 14: morfologia grande; 15: morfologia média; 16: 3 isolados de *S. mutans*.

Variáveis dietéticas sozinhas nunca explicaram mais de 6% da variância no incremento da cárie. Outros determinantes incluindo higiene oral, índice de placa bacteriana dental, freqüência da escovação dental, relação com fluoretação, educação da mãe e condição sócio-econômica têm sempre explicado a maior parte da variância (VAN LOVEREN et al., 2001).



Foi observado um contraste entre dois isolados de *S. mutans* por indivíduo e um isolado de *S. mutans* por indivíduo no terceiro fator, isso ocorreu por serem variáveis excludentes. O quarto fator foi totalmente dominado pela variável “pai” como componente familiar. O quinto fator apresentou um contraste entre consumo de sacarose baixo e moderado, por serem excludentes. Também foi observado um contraste no sexto fator, envolvendo a variável: diversas morfologias de colônia. Finalmente o sétimo fator foi dominado pela variável 3 isolados de *S. mutans*. Sendo o número de isolados um fator importante para determinação da associação positiva com a epidemiologia da doença.

As variáveis que mais contribuíram para a variância total, em ordem de grandeza das distâncias euclidianas, foram: um isolado de *S. mutans*, idade; pai como componente familiar e dois isolados de *S. mutans* por indivíduo. Isso ocorreu devido a forte associação de três isolados de *S. mutans* por indivíduo, com a epidemiologia da doença cárie nas famílias estudadas; a idade apresentou grande variância (um mês a 50 anos) e o pai como componente familiar também com variância, pois três famílias eram compostas apenas por mãe e filhos.

Em um estudo com estatística multivariada, KNEIST et al. (2001), buscou correlacionar a transmissibilidade de estreptococos do grupo mutans entre 155 crianças alemãs de 30 meses de idade e suas mães. Associação significativa foi observada entre as variáveis: contagem de *S. mutans*, índice de cárie e hábito da mamada noturna.

Assim, a concepção da natureza multifatorial da cárie dental é fundamental ao estudo desta doença, a qual está sujeita às próprias condições sócio-econômicas, culturais e ambientais de uma população (BRATTHALL, 1992). Este aspecto justifica os melhores resultados obtidos em modelos de predição que consideram diferentes fatores de risco simultaneamente para a classificação quanto ao risco de cárie dental (DEMERS et al., 1990; GRINDEFJORD et al., 1996).

Verificou-se que não existe um fator determinante da doença cárie para a população em geral, porém os fatores variam dependendo do contexto. De acordo com os resultados da pesquisa, dentro de um programa de prevenção em Saúde Pública as variáveis: presença de cárie ativa, dieta cariogênica e número de isolados de *S. mutans* na saliva devem ser investigados, pois caracterizam todo um conjunto da manifestação clínica da doença.

## 5.6 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA

Com objetivo de observar a variabilidade genética entre isolados de estreptococos do grupo mutans, por meio de marcadores RAPD, foram utilizadas 64 isolados de *S. mutans* e dez de *S. sobrinus*, provenientes de amostras salivares de nove famílias de baixa renda, residentes em Curitiba. Como grupo externo foram utilizadas duas linhagens de *S. pyogenes* e como referência a linhagem ATCC 25175 de *S. mutans* (Tabela 13).

TABELA 13 - LINHAGENS UTILIZADAS NO ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *S. mutans*, POR MARCADORES RAPD

Número	Isolado	Nomenclatura no estudo *	Origem **
1	<i>S. mutans</i>	SM1-M	Mãe-família 1
2	<i>S. mutans</i>	SM2-M	Mãe-família1
3	<i>S. mutans</i>	SM3-F	Filho-família1
4	<i>S. mutans</i>	SM4-F	Filho-família1
5	<i>S. mutans</i>	SM5-M	Mãe-família2
6	<i>S. mutans</i>	SM6-P	Pai-família2
7	<i>S. mutans</i>	SM7-F1	Filho1-família2
8	<i>S. mutans</i>	SM8-F1	Filho1-família2
9	<i>S. mutans</i>	SM9-F1	Filho1-família2
10	<i>S. mutans</i>	SM10-F2	Filho2-família2
11	<i>S. mutans</i>	SM11-F2	Filho2-família2
12	<i>S. mutans</i>	SM12-F3	Filho3-família2
13	<i>S. mutans</i>	SM13-P	Pai-família3
14	<i>S. mutans</i>	SM14-P	Pai-família3
15	<i>S. mutans</i>	SM15-M	Mãe-família3
16	<i>S. mutans</i>	SM16-F1	Filho1-família3
17	<i>S. mutans</i>	SM17-M	Mãe-família4
18	<i>S. mutans</i>	SM18-P	Pai-família4
19	<i>S. mutans</i>	SM19-P	Pai-família4
20	<i>S. mutans</i>	SM20-F1	Filho1-família4
21	<i>S. mutans</i>	SM21-F1	Filho1-família4
22	<i>S. mutans</i>	SM22-F2	Filho2-família4
23	<i>S. mutans</i>	SM23-F2	Filho2-família4
24	<i>S. mutans</i>	SM24-F3	Filho3-família4
25	<i>S. mutans</i>	SM25-N	Neta-família4
26	<i>S. mutans</i>	SM26-N	Neta-família4
27	<i>S. mutans</i>	SM27-P	Pai-família5
28	<i>S. mutans</i>	SM28-M	Mãe-família5
29	<i>S. mutans</i>	SM29-M	Mãe-família5
30	<i>S. mutans</i>	SM30-F1	Filho1-família5
31	<i>S. mutans</i>	SM31-F1	Filho1-família5
32	<i>S. mutans</i>	SM32-F1	Filho1-família5
33	<i>S. mutans</i>	SM33-F2	Filho2-família5
34	<i>S. mutans</i>	SM34-F2	Filho2-família5
35	<i>S. mutans</i>	SM35-F2	Filho2-família5
36	<i>S. mutans</i>	SM36-F3	Filho3-família5
37	<i>S. mutans</i>	SM37-F3	Filho3-família5
38	<i>S. mutans</i>	SM38-M	Mãe-família6

## Continuação

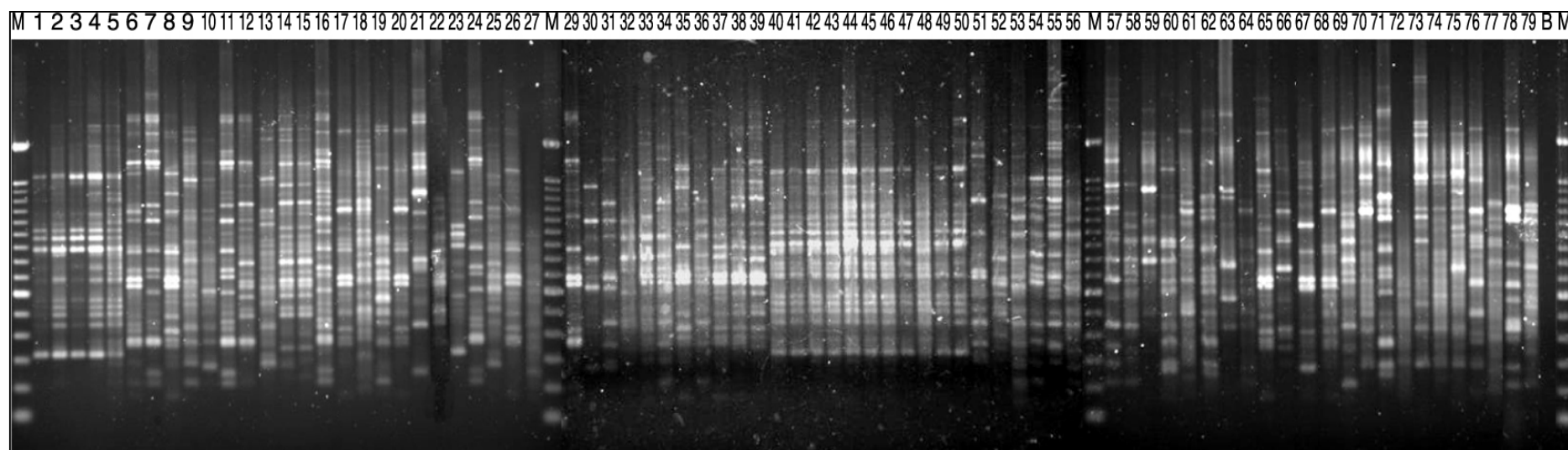
Número	Isolado	Nomenclatura no estudo *	Origem **
39	<i>S. mutans</i>	SM39-P	Pai-família6
40	<i>S. mutans</i>	SM40-P	Pai-família6
41	<i>S. mutans</i>	SM41-F1	Filho1-família6
42	<i>S. mutans</i>	SM42-F1	Filho1-família6
43	<i>S. mutans</i>	SM43-F2	Filho2-família6
44	<i>S. mutans</i>	SM44-F3	Filho3-família6
45	<i>S. mutans</i>	SM45-F3	Filho3-família6
46	<i>S. mutans</i>	SM46-F4	Filho4-família6
47	<i>S. mutans</i>	SM47-F4	Filho4-família6
48	<i>S. mutans</i>	SM48-F4	Filho4-família6
49	<i>S. mutans</i>	SM49-F5	Filho5-família6
50	<i>S. mutans</i>	SM50-M	Mãe-família7
51	<i>S. mutans</i>	SM51-P	Pai-família7
52	<i>S. mutans</i>	SM52-F1	Filho1-família7
53	<i>S. mutans</i>	SM53-F2	Filho2-família7
54	<i>S. mutans</i>	SM54-F2	Filho2-família7
55	<i>S. mutans</i>	SM55-F1	Filho1-família8
56	<i>S. mutans</i>	SM56-F2	Filho2-família8
57	<i>S. mutans</i>	SM57-F2	Filho2-família8
58	<i>S. mutans</i>	SM58-F3	Filho3-família8
59	<i>S. mutans</i>	SM59-M	Mãe-família8
60	<i>S. mutans</i>	SM60-F1	Filho1-família9
61	<i>S. mutans</i>	SM61-M	Mãe-família9
62	<i>S. mutans</i>	SM62-M	Mãe-família9
63	<i>S. mutans</i>	SM63-F2	Filho2-família9
64	<i>S. mutans</i>	SM64-F3	Filho3-família9
65	<i>S. mutans</i>	ATCC	ATCC 25175
66	<i>S. sobrinus</i>	SS66-F	Filho1-família3
67	<i>S. sobrinus</i>	SS67-F3	Filho3-família7
68	<i>S. sobrinus</i>	SS68-F1	Filha1-família8
69	<i>S. sobrinus</i>	SS69-F1	Filho1-família9
70	<i>S. sobrinus</i>	SS70-P	Pai-família3
71	<i>S. sobrinus</i>	SS71-P	Pai-família3
72	<i>S. sobrinus</i>	SS72-M	Mãe-família8
73	<i>S. sobrinus</i>	SS73-M	Mãe-família9
74	<i>S. sobrinus</i>	SS74-M	Mãe-família7
75	<i>S. sobrinus</i>	SS75-P	Pai-família7
77	<i>S. pyogenes</i>	SP77	Surto faringite
78	<i>S. pyogenes</i>	SP78	Surto faringite

Legenda: \* SM - *S. mutans*, SS - *S. sobrinus*, SP- *S.*; M - mãe, P - pai, F1- primeiro filho, F2 - segundo filho, F3 - terceiro filho, F4 - quarto filho, F5 - quinto filho, N - neto; ATCC - linhagem referência de *S. mutans*.

\*\* Filho1 - primeiro filho, Filho2 - segundo filho, Filho3 - terceiro filho, Filho4 - quarto filho, Filho5 - quinto filho.

Neste estudo, foram utilizados cinco *primers* (Tabela7), resultando em um total de 96 marcadores. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 0,3Kb a 2kb e o perfil de amplificação com o *primer* OPA 9 pode ser visualizado na Figura 4.

FIGURA 4 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD OBTIDO DE *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. pyogenes* UTILIZANDO O PRIMER OPA 9



Eletroforese em gel de agarose a 1,4%. Amostras de número 1 a 64 linhagens de *S. mutans* isoladas das nove famílias estudadas, onde: de 1 a 4 são isolados da família I, de 5 a 12 da família II, de 13 a 16 da família III, de 17 a 26 da família IV, de 27 a 37 da família V, de 38 a 49 da família VI, de 50 a 54 da família VII, de 55 a 59 da família VIII e de 60 a 64 provenientes da família IX; amostra 65 linhagem referência de *S. mutans*, do número 66 a 75 isolados de *S. sobrinus* das nove famílias estudadas; amostras 77 e 78 isolados de *S. pyogenes*, M marcador de peso molecular (Ladder de 100 pb), B controle negativo, sem DNA.

De acordo com o perfil de amplificação observado (Figura 4), verificou-se a presença de polimorfismo entre os isolados do mesmo indivíduo, e entre os provenientes de indivíduos na mesma família e das diferentes famílias. A análise dos dados, utilizando o programa NTSYSpc 2.1, o coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA, gerou um dendrograma que demonstrou a separação dos isolados em três grupos com maior consistência, e valores de *bootstrap* acima de 95% (Figura 5).

FIGURA 5 - DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA OBTIDA POR MARCADORES RAPD DAS LINHAGENS DESCRITAS NA TABELA 13, UTILIZANDO-SE O COEFICIENTE DE JACCARD E MÉTODO DE AGRUPAMENTO UPGMA

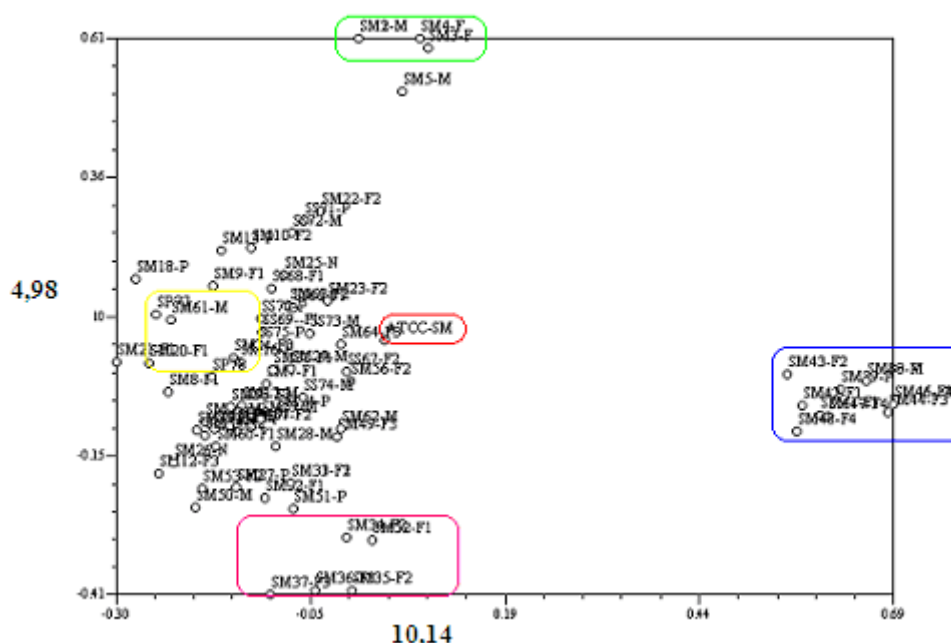


Legenda: isolados de *S. mutans* (SM) de 1 a 64, *S. sobrinus* (SS) de 66 a 75, *S. pyogenes* (SP) 77-78 (em azul), linhagem referência de *S. mutans* ATCC 25175 (em vermelho).

O grupo I reuniu cinco isolados de *S. mutans* (quatro da família 1, SM1 a SM4; e um da família 2, SM5), com similaridade de aproximadamente 70% entre eles. O valor *bootstrap* (97%) mostrou a confiabilidade do agrupamento. O agrupamento II reuniu 11 isolados de *S. mutans* provenientes da família 6 (SM38 a SM48), com similaridade de 77% e valor de *bootstrap* de 100%. Alguns isolados foram reunidos em pequenos agrupamentos com baixa similaridade, porém com relativa consistência: SM9 e SM10 procedentes de isolados da família 2; SM35, SM36 e SM37, assim como SM32 e SM34 da família 5; SM51 e SM52 da família 7. O agrupamento III reuniu as duas linhagens de *S. pyogenes*, utilizadas como grupo externo neste estudo, e os demais agrupamentos formados tiveram baixo valor de *bootstrap*, sugerindo que provavelmente, existiram indivíduos intermediários a estes.

De acordo com os resultados visualizados no gráfico bidimensional, gerado por análise de componentes principais (Figura 6), observou-se que os agrupamentos formados por isolados das famílias 1, 5 e 6 foram os de maior similaridade genética intrafamiliar, formando agrupamentos consistentes com valores de *bootstrap* elevados.

**FIGURA 6 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS REPRESENTANDO O POLIMORFISMO GENÉTICO DOS ISOLADOS DE *S. mutans***



Legenda: Agrupamento sinalizado em verde – isolados de *S. mutans* da família 1; em azul - isolados de *S. mutans* da família 6; em rosa- isolados de *S. mutans* da família 5; em amarelo – isolados de *S. pyogenes*; em vermelho linha referência de *S. mutans*.

Na Figura 6, pode-se observar que os isolados da família 6 apresentaram-se mais distantes em relação aos demais, e verificou-se que as famílias 1 e 5 mostravam uma maior similaridade entre si.

Em função dos agrupamentos formados na matriz bidimensional, foi realizada a Análise de Variância de Marcadores Moleculares (AMOVA), com o objetivo de esclarecer as variações observadas dentro e entre os agrupamentos. Para tanto foram considerados como população 1: isolados da família 1 (sinalizado em verde na Figura 6) e isolado SM5; população 2: isolados da família 6 (azul na Figura 6); população 3: isolados de filhos da família 5 (rosa na Figura 6); população 4: Isolados de SP (*S. pyogenes*). As populações de 1 a 3 foram consideradas como grupo 1, e a população 4 (*S. pyogenes*) como grupo 2. Observou-se que a maior parte da variação (60%) foi encontrada entre populações nos grupos (Tabela 14), especialmente dentro da população 3 (Tabela 15), o que corrobora os dados das Figuras 5 e 6. As populações 2 (com isolados da família 6) e 4 (com isolados de *S. pyogenes*) foram as mais distantes entre si (Tabela 15).

Entre as populações 1, 2 e 3 houve a maior parte da variação, entretanto a variação entre grupos, pela AMOVA, não foi significativo ( $p=0,23$ ) (Tabela 14), ou seja, não se pode afirmar que as mesmas são distintas ao grupo externo. Desta forma, a variação entre as populações, dentro do grupo 1 (que compreende isolados das famílias 1, 5 e 6) foi tão alta que impossibilitou a detecção de variação entre este grupo 1 e o grupo 2 (que reúne isolados de *S. pyogenes*), corroborando com a Figura 6, que mostra os isolados de *S. pyogenes* com grande proximidade com os demais isolados de *S. mutans* e *S. sobrinus*.

TABELA 14 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE MARCADORES MOLECULARES

Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	% de Variação
Entre grupos	1	45.989	2.24616 Va	10,71
Entre populações nos grupos	2	194.067	12.50588 Vb	59,60
Dentro de populações	21	130.825	6.22975 Vc	29,69
Total	24	370.880	20.98179	

Índices de fixação: FSC: 0.66749 ( $p=0.0$ ); FST: 0.70309 ( $p=0.0$ ); FCT: 0,10705 ( $p=0,23$ ).  
GL: grau de liberdade.

TABELA 15 - AMOVA. VARIÂNCIA OBSERVADA DENTRO E ENTRE AS QUATRO POPULAÇÕES OBTIDAS COM MARCADORES RAPD

	POPULAÇÃO 1	POPULAÇÃO 2	POPULAÇÃO 3	POPULAÇÃO 4
POPULAÇÃO 1	8.00000			
POPULAÇÃO 2	26.58182	8.03636		
POPULAÇÃO 3	26.80000	22.77403	23.71429	
POPULAÇÃO 4	26.40000	38.25455	22.28571	7.00000

Legenda: Em azul estão os valores médios de diferença dentro dos grupos.

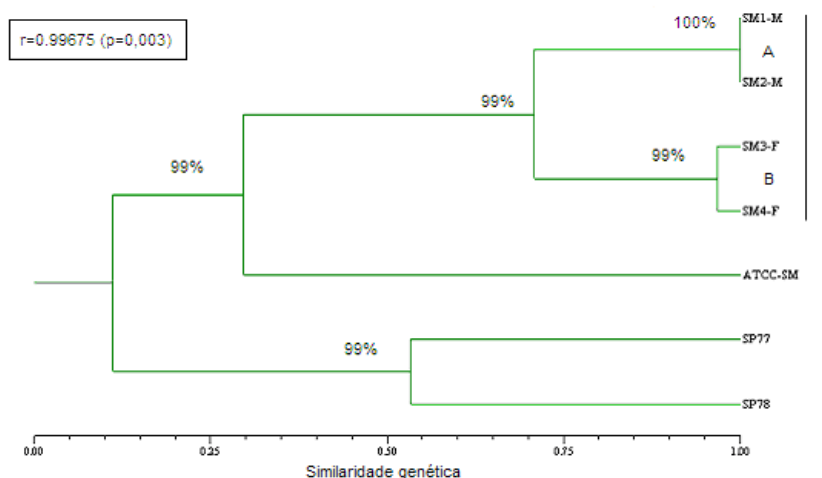
Em preto estão os valores médios de diferença entre os grupos.

Fonte: O autor

Por outro lado, houve um grande agrupamento dos outros isolados (Figura 6) onde também encontra-se posicionada a linhagem referência de *S. mutans*. Isto reforça a existência de alto polimorfismo entre os isolados de *S. mutans* e indica a necessidade de repetir tais análises acrescentando mais linhagens referência de outras espécies, como *S. sobrinus*.

A fim de visualizar possível transmissibilidade do *S. mutans* intrafamiliar, analisou-se os dados de RAPD isoladamente, por família.

FIGURA 7 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA **FAMÍLIA 1**, COMPOSTA POR MÃE E FILHO, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes*



Dendrograma gerado a partir de similaridade genética obtida por marcadores RAPD utilizando-se o coeficiente de Jaccard. SP: isolados de *S. pyogenes*, ATCC: linhagem referência de *S. mutans* e SM: isolados intrafamiliar, 1A – isolados da mãe; 1B – isolados do filho.



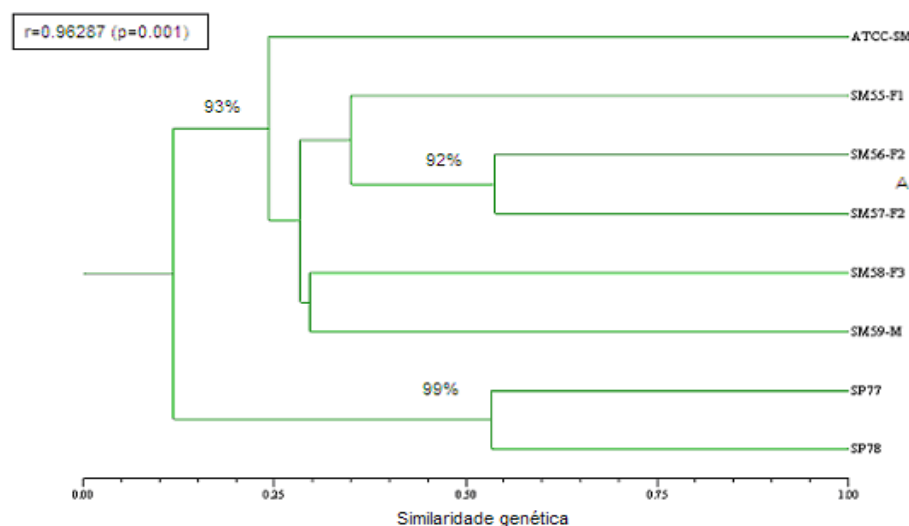
No dendrograma da Figura 7, observa-se a formação do grupo I (*bootstrap* de 99%), reunindo linhagens isoladas de mãe e filho, com similaridade de 70%. Há a formação de dois subgrupos (I-A e I-B), indicando que os isolados de mãe e filho não representavam “clones”, embora similares. O subgrupo I-A reuniu os isolados de amostra salivar materna, que apresentavam morfologia distinta de colônia (pequena e média) e similaridade genética de 100% (para estes marcadores RAPD), (*bootstrap* 100%). Tal similaridade foi observada, apesar dos padrões variáveis de macromorfologia observados. Da mesma forma no subgrupo I-B foram reunidos os isolados provenientes do filho, com padrões de morfologia diferentes (colônia média e grande) e alta similaridade genética (96%).

Estes resultados demonstraram que as variações de morfologia não refletem o perfil dos isolados e ainda sugerem a possibilidade de indivíduos monocolonizados, porém tal evidência deve ser melhor investigada, devido ao baixo número de colônias isoladas por indivíduo para este estudo. AZEVEDO et al. (1988), em um extenso trabalho de isolamento, verificou a monocolonização por estreptococos do grupo mutans em 50% dos pares mães e filho. Diversos autores (DUCHIN & VAN HOUTE, 1978; NEWBRUN, 1988; LINDQUIST, 1991) relataram que durante o isolamento são freqüentemente recuperados, em meios com forte pressão de seleção, somente bactérias de maior concentração na saliva o que não descarta a possibilidade da existência de outros. Porém é importante enfatizar que os resultados de AZEVEDO et al. (1988), foram baseados na caracterização morfológica e bioquímica dos isolados.

Ainda na família 1 foi observado que o filho, colonizado por isolados diferentes dos isolados da mãe, apresentava cárie ativa associada ao alto consumo de sacarose com elevado histórico de ocorrência da doença. Enquanto que a mãe tinha prótese total, o que representa uma condição diferenciada de colonização.

Na família 8, entretanto, todos os isolados analisados apresentaram baixos valores de similaridade genética, como isolados do filho 2 com similaridade genética de 55% (Figura 8). Ainda nesta família, foi observado que a mãe e filho 2 tinham cárie ativa e seus isolados apresentavam grande distância genética (73%), sugerindo assim, a circulação de isolados geneticamente diferentes dentro de uma mesma família.

FIGURA 8 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA **FAMÍLIA 8**, COMPOSTA POR MÃE E TRÊS FILHOS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes*

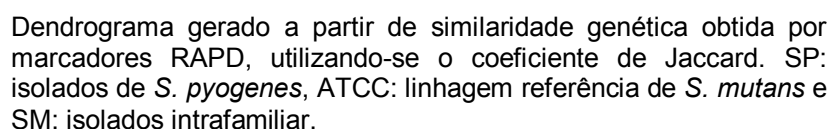


Dendrograma gerado a partir de similaridade genética obtida por marcadores RAPD utilizando-se o coeficiente de Jaccard. SP: isolados de *S. pyogenes*, ATCC: linhagem referência de *S. mutans* e SM: isolados intrafamiliar. Grupo A isolados do filho 2.

Isolados de um mesmo indivíduo, com similaridade genética variando entre 30 a 77%, demonstrando a existência de multicolonização, foram verificados nas famílias 2 (Figura 9), 3 (Figura 10), 5 (Figura 11) e 7 (Figura 12). Nestas famílias foi verificada também variabilidade entre os isolados de indivíduos diferentes, com similaridade genética variando entre 25 a 70%. Tais resultados vêm de encontro com o relatado por KULKARNI (1989) e KOZAI et al. (1999), que encontraram indivíduos colonizados por diferentes linhagens de *S. mutans* na mesma família.

A análise da relação entre a manifestação da cárie dental e a produção de anticorpos contra estas bactérias, em estudos realizados no Brasil (FERNANDES et al., 1995; NASPTIZ et al., 1999) e em outros países (BRATTHALL et al., 1997; SMITH et al., 1998), não fornece dados conclusivos.

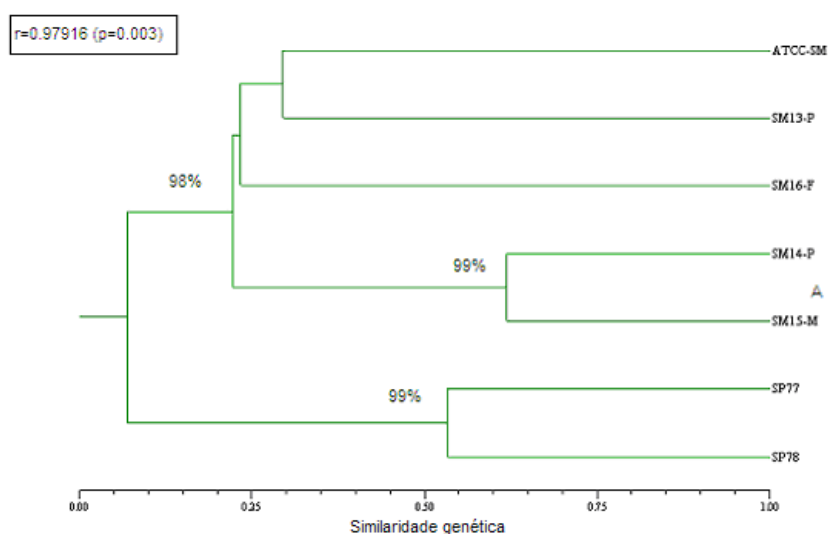
FIGURA 9 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA **FAMÍLIA 2**, COMPOSTA POR MÃE, PAI E TRÊS FILHOS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes*



Segundo KÖHLER, BRATTHALL e KRASSE (1983), o aumento do risco de infecção em crianças quando a mãe possui altos índices de *S. mutans* tem sido relatado, pois a mãe é freqüentemente a principal fonte de infecção em crianças colonizadas (CAUFIELD, 1993). Tal fato não ficou evidenciado para a família 2, com os isolados identificados no estudo.

Na família 3 (Figura 10) foi verificado que isolados do pai e da mãe com similaridade genética de 62% foram reunidos no grupo A (*bootstrap* 99%), porém apenas a mãe apresentava atividade de cárie, sugerindo isolados geneticamente diferentes com potencial de virulência diferenciados. De acordo com a literatura, a transmissão de microrganismos entre adultos com flora bucal estabelecida pode ocorrer, porém, não necessariamente seguida de colonização. Indivíduos adultos apresentam uma microflora indígena extremamente adaptada ao ambiente bucal, competindo efetivamente com colonizadores exógenos. Além disso, espécies bacterianas que são membros da flora bucal residente em humanos podem incluir um número relativamente grande de variáveis genéticas (NIE et al., 2002).

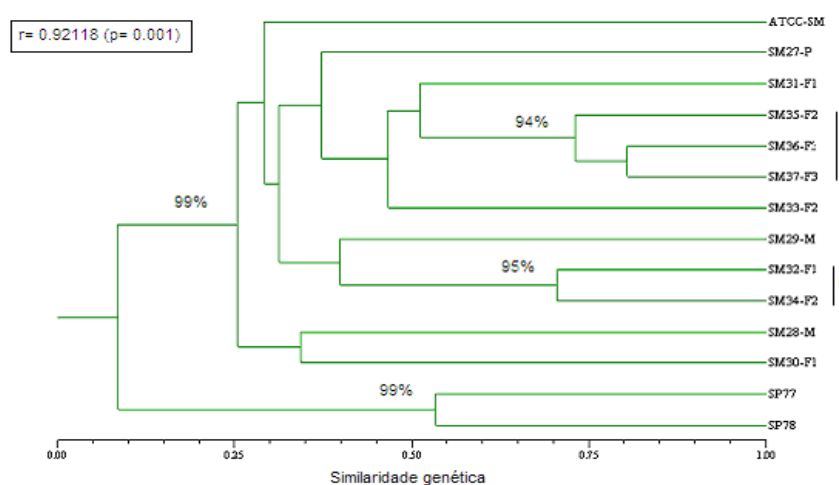
FIGURA 10 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA **FAMÍLIA 3**, COMPOSTA POR MÃE, PAI E UM FILHO, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes*



Dendrograma gerado a partir de similaridade genética obtida por marcadores RAPD utilizando-se o coeficiente de Jaccard. SP: isolados de *S. pyogenes*, ATCC: linhagem referência de *S. mutans* e SM: isolados intrafamiliar. A - isolados do pai e da mãe.

Como já observado para as famílias 2, 3 (Figuras 9 e 10), para as famílias 5 e 7 (Figuras 11 e 12), não verificou-se padrão de transmissibilidade de *S. mutans*. Houve pelo contrário, grande variabilidade genética entre os isolados analisados.

FIGURA 11 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA **FAMÍLIA 5**, COMPOSTA POR MÃE, PAI E TRÊS FILHOS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes*



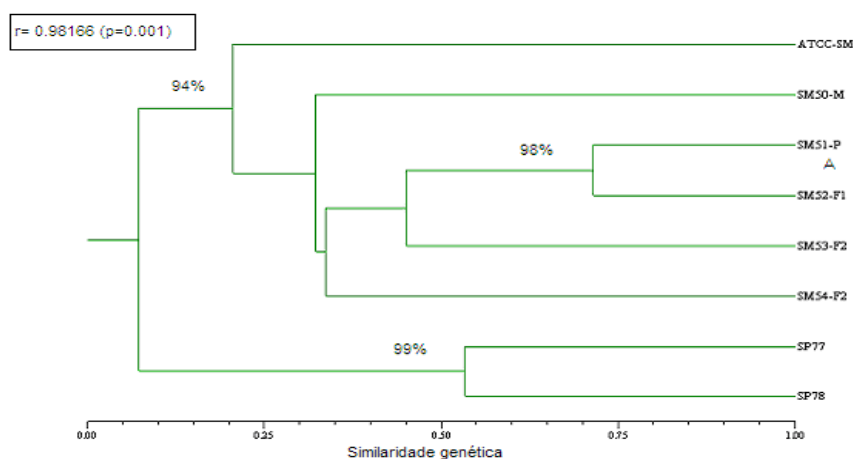
Dendrograma gerado a partir de similaridade genética obtida por marcadores RAPD utilizando-se o coeficiente de Jaccard. SP: isolados de *S. pyogenes*, ATCC: linhagem referência de *S. mutans* e SM: isolados intrafamiliar. I - agrupamento de isolados filhos 2 e 3; II - agrupamento de isolados filhos 1 e 2.

Na família 5, entre os três filhos, apenas o filho 1 que era meio irmão apresentava atividade de cárie, sugerindo a importância do hospedeiro na colonização e expressão da virulência do *S. mutans*. Entretanto, pouca informação existe disponível sobre a relação entre a diversidade clonal e características de virulência em *S. mutans*, assim como comparação entre linhagens isoladas de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos.

No estudo de NAPIMOGA (2004), foi encontrado um maior número de genótipos na cavidade bucal de indivíduos cárie-ativos quando comparado aos indivíduos livres de cárie, corroborando estudos prévios de ALALUUSUA et al. (1996), indicando correlações diferentes daquelas citadas por AZEVEDO et al. (1988), baseado em parâmetros de isolamento, caracterização morfológica e bioquímica.

Por outro lado, KREULEN et al. (1997), sugeriram que clones específicos de *S. mutans* são selecionados em crianças com alta atividade de cárie. Esses autores avaliaram a diversidade de clones de *S. mutans* isolados de sete pares de irmãos, sendo que um dos irmãos apresentava cárie rampante e outro apresentava baixa atividade de cárie, demonstrando ainda que crianças que apresentavam cárie rampante apresentavam apenas um clone de *S. mutans*, enquanto os irmãos com baixa atividade de cárie apresentavam de dois a cinco clones distintos.

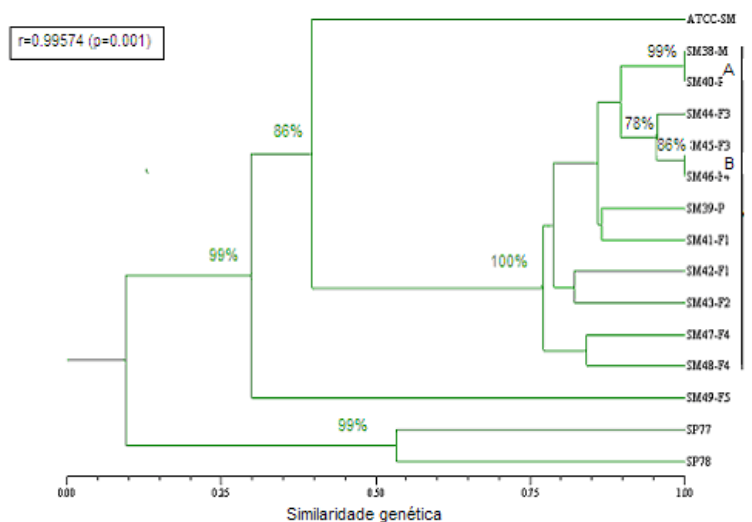
FIGURA 12 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* DE AMOSTRAS SALIVARES DA **FAMÍLIA 7**, COMPOSTA POR MÃE, PAI E DOIS FILHOS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes*



Dendrograma gerado a partir de similaridade genética obtida por marcadores RAPD utilizando-se o coeficiente de Jaccard. SP: isolados de *S. pyogenes*, ATCC: linhagem referência de *S. mutans* e SM: isolados intrafamiliar. A – isolados do pai e filho 1.

No dendrograma gerado para a família 6 (Figura 13), verificou-se a ocorrência de isolados de maior similaridade, obtidos de indivíduos diferentes. Foi verificado um grupo reunindo isolados provenientes da saliva do pai, mãe e quatro filhos, com similaridade de aproximadamente 77% (*bootstrap* de 100%). Neste agrupamento houve a formação de dois subgrupos com similaridade genética de 100% entre os isolados, a partir dos *primers* utilizados. No subgrupo I-A, verificou-se isolados do pai e da mãe, e no segundo (I-B) isolados dos filhos 3 e 4.

FIGURA 13 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* DE AMOSTRAS SALIVARES DE INDIVÍDUOS DA **FAMÍLIA 6**, COMPOSTA POR MÃE, PAI E CINCO FILHOS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes*



Dendrograma gerado a partir de similaridade genética obtida por marcadores RAPD, utilizando-se o coeficiente de Jaccard. SP: isolados de *S. pyogenes*, ATCC: linhagem referência de *S. mutans* e SM: isolados intrafamiliar. A – isolados da mãe e pai; B – isolados dos filhos 3 e 4.

Observou-se ainda que, os filhos 3 e 4, ambos com atividade de cárie, apresentaram isolados (SM45-F3 e SM46-F4), com morfologias distintas, porém com similaridade de 100%. Indicando que a diferença de morfologia colonial não está necessariamente relacionada à diferenças genéticas, da mesma forma que o anteriormente observado para os isolados da família 1.

Durante o isolamento foram observadas variações de colônias (pequenas, médias, grandes e puntiformes) utilizadas como um dos critérios de isolamento, sendo que pelo menos uma amostra dos diferentes padrões observados foi recuperada. Tal fato, embora qualitativamente representasse o padrão microbiológico dos indivíduos analisados, quantitativamente dificultou a formação de agrupamentos consistentes dos isolados obtidos, uma vez que não foram analisadas todas as colônias crescidas no meio de cultura.

Porém, o fato de isolados de dois filhos (SM45-F3 e SM46-F4) e de esposos (SM38-M e SM40-P) apresentarem 100% de similaridade (Figura 13), demonstrou a ocorrência de um mesmo isolado em duas bocas diferentes, para cada par analisado, sugerindo assim a transmissão intrafamiliar.

A similaridade genética de *S. mutans* entre esposos tem sido relatada como evidência da possibilidade de que a transmissão e aquisição podem ocorrer entre adultos (CAUFIELD & WALKER, 1989; KULKARNI et al., 1989; SAARELA et al., 1993; LI & CAULFIELD, 1995; REDMO et al., 1998).

Segundo SMITH (1998), a ocorrência da transmissão de *S. mutans* em humanos é fato evidente. Contudo, a variação deste evento pode estar associada à suscetibilidade individual, incluindo o período definido como janela de infectividade na infância, erupção dos dentes molares, hipoplasia do esmalte dentário, dieta cariogênica com sacarose, ação de fatores não específicos do sistema imune salivar e de mucosas, e condições imunológicas do hospedeiro.

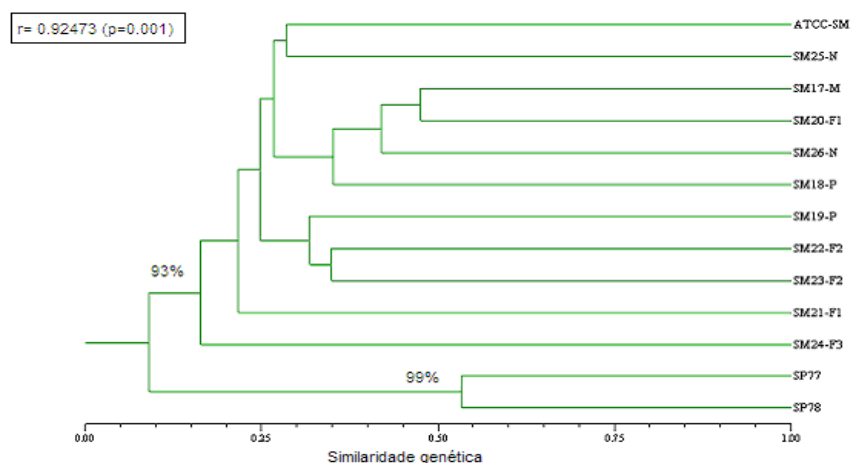
Ainda em relação aos isolados da família 6, o SM49 proveniente de amostra salivar de criança com um mês de idade, agrupou-se separadamente do grupo I, apresentando uma relação distante dos isolados de *S. mutans* desta família. Para UZEDA (2002), o microrganismo que primeiramente coloniza a cavidade bucal, aderindo-se, preferencialmente, às células epiteliais da bochecha e do dorso da língua é o *S. salivarius*, e de acordo com Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2001), bioquimicamente este microrganismo não metaboliza sorbitol e manitol.

Esses relatos apontam a possibilidade do isolado SM49 ser de *S. salivarius*, porém os resultados dos testes bioquímicos (Tabela 9) revelaram que o isolado possuía as características bioquímicas compatíveis ao grupo mutans e sendo assim não poderia ser identificado como *S. salivarius*. No entanto, os agrupamentos observados por meio dos marcadores RAPD revelaram a baixa similaridade genética do isolado. Para maiores inferências faz-se necessário um maior número de linhagens referências do grupo mutans, demonstrando assim a importância da associação de vários parâmetros na investigação deste grupo.

Para os isolados das famílias 4 e 9, um alto polimorfismo sem formação de agrupamentos consistentes foi observado (Figuras 14 e 15 respectivamente). Esses resultados vêm de encontro com o relatado por SPOLIDORIO (2003), sugerindo que membros da mesma família podem abrigar clones geneticamente diferentes.



FIGURA 14 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* DE AMOSTRAS SALIVARES DA **FAMÍLIA 4**, COMPOSTA POR MÃE, PAI E TRÊS FILHOS E UMA NETA, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes*



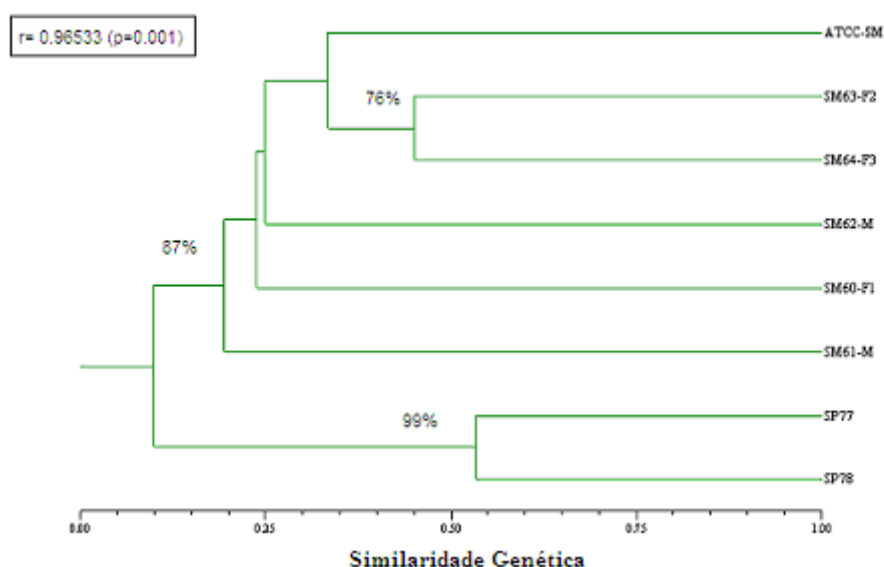
Dendrograma gerado a partir de similaridade genética obtida por marcadores RAPD, utilizando-se o coeficiente de Jaccard. SP: isolados de *S. pyogenes*, ATCC: linhagem referência de *S. mutans* e SM: isolados intrafamiliar.

Dentre as famílias, a que apresentou maior concentração de indivíduos cárie ativos foi a família 4, apresentando também uma das menores rendas *per capita* mensal. SPOLIDORIO (2004), avaliando 200 crianças brasileiras de cinco diferentes classes sócio-econômicas, verificou que o *S. mutans* foi encontrada em todas as categorias. Os diferentes padrões genéticos dos isolados da família 4 demonstram a existência de grande variabilidade, que associados aos diferentes padrões intrafamiliar, indicam a necessidade de estudos direcionados, com maior número de isolados por indivíduo, possibilitando assim o entendimento destas inferências.

Na família 9 (Figura 15), apenas o filho 3 (gêmeo do filho 2) apresentou atividade de cárie, porém com baixa concentração de estreptococos do grupo mutans. De acordo com os dados da literatura a concentração de *S. mutans* está fortemente associada ao risco de desenvolvimento à doença (DUCHIN & VAN HOUTE, 1978; LINDQUIST, 1991), porém baixas contagens de *S. mutans* associadas à ocorrência de lesões cariosas, freqüentemente são atribuídas a virulência dos isolados (MATTOS-GRANER et al., 2000).

Alguns autores (VAN HOUTE et al., 1996) justificam as interações dos diferentes grupos da cavidade bucal como potencializadores da virulência de microrganismos como o *S. mutans*.

FIGURA 15 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* DE AMOSTRAS SALIVARES DA **FAMÍLIA 9**, COMPOSTA POR MÃE E TRÊS FILHOS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes*



Dendrograma gerado a partir de similaridade genética obtida por marcadores RAPD, utilizando-se o coeficiente de Jaccard. SP: isolados de *S. pyogenes*, ATCC: linhagem referência de *S. mutans* e SM: isolados intrafamiliar.

EMILSON et al. (1987), demonstraram que linhagens isoladas de indivíduos pertencentes a uma população com baixíssima incidência de cárie, eram capazes de induzir lesões de cárie avançadas em modelo animal. Os autores sugerem que a baixa atividade de cárie apresentada por esta população não seria apenas devido á virulência dos *S. mutans*, onde fatores, como a dieta, características endógenas do hospedeiro poderiam estar associados. Em contraste KÖHLER e KRASSE (1990) observaram que linhagens de *S. mutans* isoladas de crianças livres de cárie portadoras de altos níveis de *S. mutans* demonstraram baixa cariogenicidade em modelos animais.

Estas divergências encontradas na literatura demonstram a complexidade envolvida na expressão de virulência por microrganismos cariogênicos. A produção de ácidos, a capacidade de metabolização de substratos em meio ácido e de aderir às superfícies lisas, são os mecanismos de virulência fortemente associados à bactéria *S. mutans*. NAPIMOGA (2004) concluiu em seu trabalho que indivíduos cárie ativos abrigavam maior número de genótipos de *S. mutans* com alta capacidade de sintetizar glicanos insolúveis, que promovem aderência.

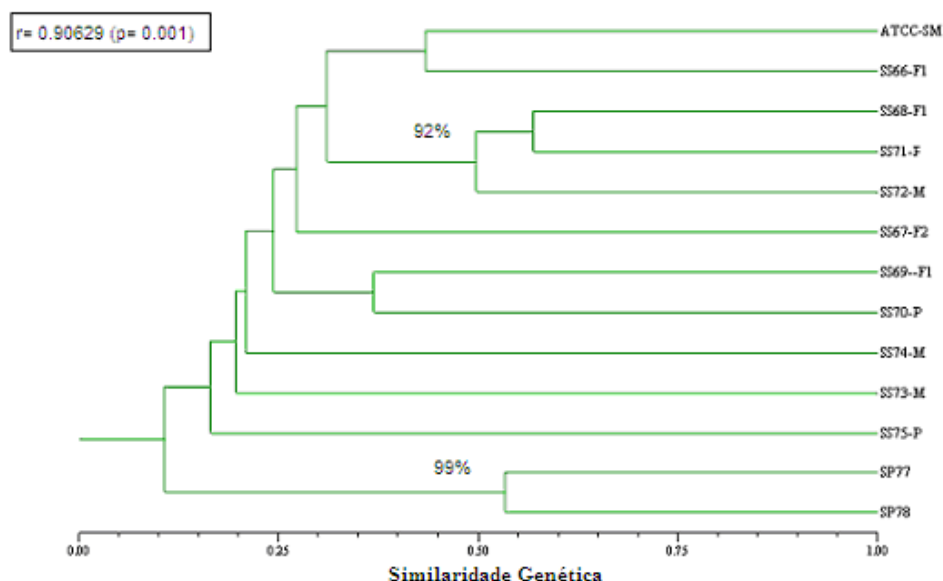
Para todos os dendrogramas gerados a partir dos isolados das nove famílias, a linhagem referência ATCC de *S. mutans* agrupou-se com isolados intrafamiliar de forma semelhante, com similaridade de aproximadamente 25% (40% foi a maior similaridade observada - família 6), com agrupamentos consistentes (*bootstrap* na média de 90%). Sugerindo assim, que os isolados destas famílias são geneticamente distantes em relação à linhagem referência utilizada.

Estudos mostraram que o *S. mutans* corresponde a 74 a 94% das amostras de estreptococos do grupo mutans. E está associado com o desenvolvimento de cárie na coroa dental em diversas populações. O *S. sobrinus* é menos prevalente e tem sido relacionado com cárie de superfície lisa. A prevalência e concentração de *S. mutans* e *S. sobrinus* têm sido usadas como marcadores biológicos, preditores de cáries. Entretanto, organismos que são geneticamente heterogêneos podem apresentar fenótipos homogêneos, gerando resultados confusos dificultando a identificação precisa.

Dentro deste contexto, isolados com caracterização bioquímica sugestiva de *S. sobrinus* e que não formaram um agrupamento consistente foram analisados separadamente, incluindo a linhagem referência de *S. mutans* e os isolados de *S. pyogenes* e o dendrograma gerado foi apresentado na Figura 16. Neste dendrograma com os isolados de *S. sobrinus*, não foi verificada formação de agrupamentos com alta similaridade genética, bem como os nós não geraram valores bem suportados por *bootstrap*.

Pela análise de agrupamento (UPGMA), o perfil de amplificação gerou os mais diversos padrões e graus de similaridade genética entre os isolados dos indivíduos das famílias estudadas. Estes resultados suportam a visão que a distribuição intrafamiliar deste microrganismo cariogênico parece ser diferente de família para família, fato já relatado anteriormente por REDMO et al. (1998).

FIGURA 16 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. sobrinus* DE AMOSTRAS SALIVARES DOS INDIVÍDUOS DAS FAMÍLIAS, LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E ISOLADOS DE *S. pyogenes*



Dendrograma gerado a partir de similaridade genética obtida por marcadores RAPD, utilizando-se o coeficiente de Jaccard. SP: isolados de *S. pyogenes*, ATCC: linhagem referência de *S. mutans* e SM: isolados intrafamiliar.

Ainda o presente estudo sugeriu que, em determinados indivíduos podem ter ocorrido infecções múltiplas, dados estes suportados pela grande variabilidade encontrada por meio dos marcadores RAPD. Uma amostragem de HLA poderia elucidar e caracterizar melhor as rotas de transmissão e colonização por *S. mutans* e o papel do sistema imune do hospedeiro.

A dieta cariogênica, rica em sacarose, esteve fortemente associada ao padrão de desenvolvimento da cárie dental, relacionada à presença de cárie ativa. Esta evidência reforça a necessidade de estratégias de estímulo a alimentação saudável, com redução do consumo de açúcares, ainda que este seja um dos maiores aportes energéticos para as famílias de baixa renda, uma vez que culturalmente está inserido no contexto alimentar, favorecido pelo seu baixo custo.

Desta forma, tem sido demonstrado que a restrição da sacarose na dieta reduz o nível de *S. mutans*. A sacarose é importante tanto para a adesão mediada pelo glicano, quanto para a produção de ácido (BALAKRISHNAN, et al., 2000).

Segundo ALALUUSUA et al. (1996), um maior número de genótipos pode ser encontrado se um maior número de linhagens forem estudadas. Desta forma, sugere-se novas análises, isolando e caracterizando o maior número possível de colônias encontradas nas amostras salivares. Além disso, para a confirmação da identidade genética dos isolados deveria ser realizada análise de marcador espécie-específico.

De acordo com os resultados, a separação em famílias foi fundamental para realização destas análises e melhor compreensão das relações de similaridade e variabilidade genética entre os isolados de *S. mutans* intrafamiliar, porém existe a necessidade de inclusão de mais linhagens referência de *S. mutans* e *S. sobrinus*, permitindo desta forma estudos de variabilidade intra e inter agrupamentos de isolados familiares.

## CONCLUSÕES

- As variáveis mais importantes para avaliação epidemiológica da doença cárie em famílias de baixa renda foram: componente familiar (fator mãe e filho), idade, número de dentes atingidos pela doença, escolaridade dos pais, presença de cárie ativa e alto consumo de sacarose.
- Baseado na correlação entre morfologia e RAPD, não foi possível estabelecer um padrão microbiológico como critério da avaliação da transmissibilidade.
- Existiu variabilidade genética entre isolados de *S. mutans* intrafamiliar e interfamiliares.
- A distribuição intrafamiliar dos isolados foi diferente de família para família, sugerindo que, em determinados indivíduos podem ter ocorrido infecções múltiplas.
- O critério qualitativo de isolamento dificultou a inferência de transmissibilidade entre os isolados dos integrantes das nove famílias, porém a existência de quatro isolados procedentes indivíduos de uma mesma família apresentando 100% de similaridade, sugeriu a transmissão intrafamiliar destes.

## REFERÊNCIAS

- ADJIC, D.; MCSHAN, W.M.; MCLAUGHLIN, R.E. et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc Natl Acad Sci, USA**:14434-14439, 1999.
- ALALUUSUA, S.; MATTÖ, J.; GRÖNROOS, L.; INNILA, S.; TORKKO, H.; ASIKAINEN, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; SAARELA, M. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. **Arch Oral Biol**, 41:167-73, 1996.
- ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell**. 3.ed. New York : Garland Publishing, 1994. 1294p.
- ANTONY, U.; MUNSHI, A.K. Sibling versus maternal *Streptococcus mutans* levels as related dental caries. **J.Clin.Pediatr.Dent**. 21,145-150. 1997.
- AXELSSON, P. et al. The effect of various plaque control measures on gingivitis and caries in school children. **Community Dent Oral Epidemiol**, 4:232-239, 1976.
- AZEVEDO, R.V.P.; NELSON FILHO, P.; ASSED, S.; ITO, I.Y. Estreptococos do grupo mutans: isolamento, identificação e prevalência das espécies na saliva de pares mãe e filho. **Rev Odontol Univ São Paulo**, 12:1, 47-50, 1988.
- BABAAHMADY, K.G.; CHALLACOMBE, S.J.; MARSH, P.D.; NEWMAN, H.N. Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus spp.* At sub-sites from approximal dental plaque from children. **Caries Res**, 32:51-58. 1998.
- BALAKRISHNAN, M.; SIMMONDS, R. S.; TAGG, J.R. Dental caries is a preventable infectious disease. **Aust Dent J**, 45(4) 235:245, 2000.
- BARBIERI, D. S.V. **Análise da aderência “in vitro” de *S. mutans* e *Cândida albicans* na superfície dentária**. Curitiba, 2005. 92p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná.
- BEIGHTON, D.; RIPPON, H.R.; THOMAS, H.E.C. The distribution of *Streptococcus mutans* serotypes and dental caries in a group of 5- to 8-year-old Hampshire schoolchildren. **Br Dent J**. 162:103-106, 1987.
- BENTLEY, R.W.; LEIGH, J.A.; COLLINS, M.D. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. **Int J Syst Bacteriol** 41:487-494, 1991.
- BERGEY, D.H. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Baltimore, Williams & Wilkins, v. 3, p.1842-1853, 2001.
- BERKOWITZ, R.J. Acquisition and transmission of mutans streptococci. **J. Calif. Dent. Assoc.** 31(2), 135-138, 2003.
- BÖNECKER, M.J.S.; GUEDES-PINTO, A.C.; WALTER, L.R.F. Prevalência, distribuição e grau de afecção de cárie dentária em crianças de 0 a 36 meses de idade. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, 51(6):535-40, 1997.
- BOWDEN, G.H. Does assessment of microbiol composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? **Community Dent Oral Epidemiol**, v.25, n.1, p. 76-81, Feb. 1997.

- BOWDEN, G.H; HAMILTON, I.R. Survival of oral bacteria. **Crit Rev Oral Biol Med.** 9: 54-85, 1998.
- BRADSHAW, D.J.; MARSH, P.D. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities *in vitro*. **Caries Res**, v.32, n.6, p.456-462, Nov/Dec. 1998.
- BRATTHALL, D. e CARLSON, J. Clinical microbiology of human saliva. Florida: **Boca Raton**, 1988.
- BRATTHALL, D. Caries, views and perspectives. **Scand J Dent Res**, v.100, n.1, p.47-51, Feb. 1992.
- BRATTHALL, D.; SERINIRACH,R.; HAMBERG,K.; WIDERSTRÖM,L. Immunoglobulin A reaction to oral streptococci in saliva of subjects with different combination of caries and levels of mutans streptococci. **Oral Microbiol Immunol**, v.12, n.4, p.212-218, Aug.1997.
- CARLSSON, P.; OLSSON,B.; BRATTHALL,D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. **Arch Oral Biol**, v.30, n.3, p.265-268, 1985.
- CAULFIELD, P.W. RATANAPRIDAKUL, K.; ALLEN, D.N. Plasmid-containing strains of *Streptococcus mutans* cluster within family and racial cohorts: implications for natural transmission. **Infect.Immun**, 56, 3216-3220, 1988.
- CAULFIELD, P.W., WALKER, T. M. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphism. **J Clin Microbiol**, 27: 274-278, 1989.
- CAUFIELD, P.W. CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: Evidence for a discrete window of infectivity. **J.Dent Res**, 72:37-45, 1993.
- CAUFIELD, P.W. Dental caries – a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. **Pediatr Dent**, 19:491-498, 1997.
- CLARKE, J.K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. **Brit J Exp Pathol**; 5: 141-147, 1924.
- COELHO, A. S. G. Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstraps. **BOOD 3.03**. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO, 2005.
- DAVEY, A.L., ROGERS,A.H. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intrafamily transmission. **Arch.Oral Biol**, 29, 453-460, 1984.
- DE SOET, J.J.; VAN LOVEREN,C.; LAMMENS, A.J.; PAVICIC, M.J.A.M.P.; HOMBURG, C.H.E.; TEN CATE, J.M.; DE GRAAFF, J. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, v.25, n.2, p.116-122, Mar./Apr,1991.
- DEMERS, M.; BRODEUR, J.M.; SIMARD, P.L.; MOUNTON, G.V.; FRÉCHETTE, S. Caries predictors suitable for mass-screenings in children: a literature review. **Community Dental Health**, v.7, n.1, p.11-21, Mar.,1990.
- DUCHIN, S.; VAN HOUTE, J. Colonization of teeth in human by *Streptococcus mutans* as related to its concentration in saliva and host age. **Infect Immun**, v. 20, n. 1, p. 120-125, Jan. 1978.
- EMANUELSSON, R.; WANG, W. Demonstration of identical strains of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. **Eur J Oral Sci**, 106: 788 -794, 1998.



EMANUELSSON, I.R., LI, Y., BRATTHALL, D. Genotyping shows different strains of mutans streptococci between father and child and within parental pairs in Swedish families **Oral Microbiol. Immunol.** 13, 271-277, 1998.

EMANUELSSON, I.M. Mutans streptococci in families and on tooth sites studies on the distribution, acquisition and persistence using DNA fingerprinting. **Swed Dent. J. Suppl.** 148, 1-66, 2001.

EMANUELSSON, I.M., THORNQVIST, E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. **Acta Odontol. Scand.** 59(2), 93-98, 2001.

EMILSON, C.G. Prevalence of *Streptococcus mutans* with different colonial morphologies in human plaque and saliva. **Scand J Dent Res.** V.91(1), p.26-32, 1983.

EMILSON, C.G.; CARLSSON, P.; BRATTHALL, D. Strains of mutans streptococci isolated in a population with extremely low caries prevalence are cariogenic in the hamster model. **Oral Microbiol Immunol**, 2:183-186, 1987.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **International Journal of Organic Evolution.** Lancaster, v.39, p.366-369, 1985.

FERNANDES, F.R.C.; NAGAO, A.T.; MAYER, M.P.A.; ZELANTE, F.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Compensatory levels of salivary IgM anti- *Streptococcus mutans* antibodies in IgA-deficient patients. **J Invest Allergol Clin Immunol**, v.5, n.3, p. 151-155, May/June 1995.

FITZGERALD, D.B.; EVANS, R.; KIRKPATRICK, D.; LOPEZ, C. Heterogeneity of human NK cells: comparison of effectors that lyse HSV-1-infected fibroblasts and K562 erythroleukemia targetset al. **Infect. Immun**, 41, 691-697, 1983.

FRAIZ, F.C. **Estudo das características de utilização de açúcar através da mamadeira, do primeiro contato com o açúcar e do padrão de aleitamento em crianças de 0 a 36 meses, Curitiba.** São Paulo, 1993. 76p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Odontologia da USP.

FRAIZ, F. C.; WALTER, L. R. F. Estudo de fatores associados à cárie dental em crianças que recebem atendimento odontológico precoce. **Pesquisa Odontológica Brasileira.** v.15, n.3, p.201-7, 2001.

FRANDSEN, E.V.; PEDRAZZOLI, V.; KILIAN, M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. **Oral Microbiol Immunol.** Jun;6(3):129-33, 1991.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia Microbiana.** Jaguariúna : Embrapa-CNPMA, Cap.8, p.205-227, 1998.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.14, p.12-16, 2000.

GABRIEL, K. R. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. **Biometrika**, v.58, n.3, p.453-467, 1971.

GIBBONS, R.J. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. **J Dent Res**, 63:378-385, 1984.

GILMOUR, M.N.; WHITTAM, T.S.; KILIAN, M.; SELANDER, R.K. Genetic relationships among the oral streptococci. **J Bacteriol**, 69: 5247-5257, 1987.

GOLD, O.G.; JORDAN, H.V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**; 18:1357-1364, 1973.

GONÇALVES, R.B.; ROSA, R.T.; STIPP, R.N.; NAPIMOGA, M.H.; ROSA, E.A.R.; HÖFLING, J.F. Genetic diversity and cariogenic potential of *Streptococcus mutans*. **J Dent Res**; 281:286, 2002.

GRINDEFJORD, M.; DAHLLÖF, G.; NILSSON, B.; MODÉER, T. Stepwise prediction of dental caries in children up to 3,5 years of age. **Caries Res**, v.30, n.4, p.256-266, July/Aug. 1996.

GRÖNROOS, L. **Quantitative and qualitative characterization of mutans streptococci in saliva and in dentition**. Academic Dissertation, August 2000. 80p. University of Helsinki, Finland.

GRONRÖÖS, L.; ALALUUSUA, S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. **Caries Res**; 34:474-80, 2000.

HAIR, J.F.Jr.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L. e BLACK, W.V. **Multivariate Data Analysis**. 5ed. Upper Saddke River: Prentice Hall, 768p. 1998.

HAIJSHENGALLIS, G.; MICHALEK, S.M. Current status of a mucosal vaccine against dental caries. **Oral Microbiol Immunol**, v.14, n.1, p.1-20, Feb. 1999.

HAMADA, S.; SLADE, H.D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**; 44:331-384, 1980.

HAMADA,S.; MASUDA,N.; KOTANI,S. Isolation and serotyping of *Streptococcus mutans* from teeth and feces of children **J. Clin. Microbiol**.11,314-318. 1980

HAMADA S. Overview of the biology of *Streptococcus mutans* . In: **Molecular microbiology and immunobiology of Streptococcus mutans**. Hamada S, Michalek S, Kiyono H, Menaker L, McGhee J, eds. Elsevier Science Publishing Inc.: New York; p.7-20, 1986.

HIRASAWA, M.; TAKADA, K. A New Selective Medium for *Streptococcus mutans* and the Distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and Their Serotypes in Dental Plaque. **Caries Research** 37:212-217, 2003.

HOMER, K.A.; WHILEY, R.A.; BEIGHTON, D. Proteolytic activity of oral streptococci. **FEMS Microbiol Lett**; 55: 257-60, 1990.

HUANG, X. et al. Typing of *Streptococcus mutans* (serotype C) by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, 36(4): 281-4, Jul 2001.

IGARASHI, T. et al. Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the dex genes. **J Microbiol Methods**, 46(2): 99-105, Aug 2001.

JACKSON, R.J.; LIM, D.V.; DAO, M.L. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. **Curr Microbiol**, 34: 49-54, 1997.

JORDAN, H.V.; VAN HOTE, R.J. Transmission of the oral bacterium *Streptococcus mutans* to young *Macaca fascicularis* monkeys from human nurse attendants. **Arch Oral Biol**, 30: 863-864, 1985.

JORGE, A.O.C. **Microbiologia Bucal**. 2ª Edição. São Paulo: Santos Livraria e Editora. 1998. 121p.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia: atividades práticas**. São Paulo: Ed. Santos, 2001. 146p.

KAISER, H.F. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika**, n.23, p.187-200, 1958.

KAMIYA, R.U. **Análise genotípica e mutacinotipagem de *Streptococcus mutans* isolados de indivíduos cárie-ativos e livres de cárie.** Tese. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2003.

KEYS, P.A. The infection and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. **Arch Oral Biol.** 1: 304-320, 1960.

KLEIN, M.I. et al. Longitudinal study of transmission, diversity and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. **Journal of Clinical Microbiol.** 42: 4620-4626, Oct 2004.

KNEIST, S.; BORUTTA, A.; EHLRLER, D.; et al. To the importance of bottle-feeding habits for the transmission of mutans streptococci from mothers to infants and their caries status among german families. **48<sup>th</sup> Annual Congress of the European Organization for Caries Research**, Austria, 2001

KOGA, C. Y. et al. Testes de atividade de cárie. Avaliação de diferentes métodos. **Preventiva**, 43(3): 141-44, 1995.

KOGA-ITO, C.Y.; et al. Caries Risk Tests and Salivary Levels of Immunoglobulins to *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in Mouthbreathing Syndrome Patients **Caries Res**, 37:38-43, 2003.

KÖHLER, B.; BRATTHALL, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* level in saliva. **J Clin Microbiol**, 9:584-588, 1979.

KÖHLER B, BRATTHALL D, KRASSE B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. **Arch Oral Biol**; 28: 225-231, 1983.

KÖHLER, B.; ANDRÉEN, I.; JONSSON, B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at four years of age. **Oral Microbiol Immunol.** 3:14-17, 1988.

KÖHLER, B.; KRASSE, B. Human strains of mutans streptococci show different cariogenic potential in the hamster model. **Oral Microbiol Immunol**, v.5, n.4, p. 177-180, Aug. 1990.

KÖHLER, B.; BIRKHED, D.; OLSSON, S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Caries Res**, 29:402-406, 1995.

KOLENBRANDER, P.E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J Bacteriol**, 175: 3247-3252, 1993.

KONEMAN, E.W.; et al. **Diagnóstico microbiológico, texto e atlas colorido.** 5.ed. Rio de Janeiro : MEDSI, 2001. 1465p.

KOZAI, K.; NAKAYAMA, R.; TEDJOSASONGKO, U.; KUWAHARA, S.; SUZUKI, J.; OKADA, M.; NAGASAKA, N. Intrafamilial distribution of mutans streptococci in Japanese families and possibility of father-to-child transmission. **Microbiol Immunol**, 43: 99-106, 1999.

KREULEN, C.M.; DE SOET, H.J.; HOGEVEEN, R.; WEERKAMP, J.S. *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. **ASDC J Dent Child**, 64:107-11, 1997.

KULKARNI, G.V.; CHAN, K.H.; SANDHAM, H.J. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. **J Dent Res**, 68: 1155-1161, 1989.

LAVORANTI, O.J. **Estabilidade e adaptabilidade fenotípica através da reamostragem “bootstrap” no modelo AMMI.** Piracicaba, 2003. 166p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

LI, Y.; CAULFIELD, P.W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **J Dent Res**, 74:681-685, 1995.

LI, Y.; CAUFIELD, P.W. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. **Oral Microbiol Immunol**, 13: 17-22, 1998.

LI,Y.; WANG, W.;CAUFIELD,P.W. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. **Caries Res**, 34: 123-132, 2000.

LI,Y.H.; LAU,P.C.Y.; LEE,J.H.; ELLEN,R.P.; CVITKOVITCH,D.G.; Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. **J Bacteriol**, 183:897-908, 2001.

LINDQUIST, B. **Mutans streptococci in human dentition**. Thesis, Göteborg: University of Göteborg, 1991.

LINDQUIST, B.; EMILSON, C. G. Dental localization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human harboring both species. **Caries Res**, v.25, p.146-152, 1991.

LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev**, v.50, n.4, p.353-380, Dec. 1986.

MALTZ,M.; ZICKERT,I. Effect of penicillin on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, and lactobacilli in hamsters and in man. **Scand J Dent Res**, 90:193-199, 1982.

MARCHANT, S. et al. The predominant microflora of nursing caries lesions. **Caries Res**, 35(6): 397-406, Nov 2001.

MASUDA, N.; SHIMAMOTO, T.; KITAMURA, K.; SOBUE, S.; HAMADA, S. Transmission of *Streptococcus mutans* in some selected families. **Microbios**, 44: 223-232, 1985.

MATEE, M.I.N.; MIKX, F.H.M.; DE SOET, J.S.; MASELLE, S.Y.; DE GRAFF, J.; VAN PALENSTEIN HELDERMAN, W.H. Mutans streptococci in caries-active and caries-free infants in Tanzania. **Oral Microbiol Immunol**, v.8, n.5, p.322-324, Oct. 1993.

MATTOS-GRANER, R.O. et al. Prevalência de estreptococos do grupo mutans em crianças de 12 a 31 meses de idade e sua associação com a frequência e a severidade da cárie dental. **Rev. Odontologia Univ. São Paulo**, 12(4): 309-314, out./dez. 1998.

MATTOS-GRANER, R.O.M. **Relação entre os níveis bucais de estreptococos do grupo mutans, alguns de seus fatores de virulência e a incidência de cárie dental em crianças de 12 a 30 meses de idade**. Tese Doutorado, USP, São Paulo, 1999.

MATTOS-GRANER, R.O.; SMITH, D.J.; KING, W.F.; MAYER, M.P. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12 to 30-months-old children. **J Dent Res**, 79:1371-77, 2000.

MATTOS-GRANER, R.O.; LI, Y.; CAUFIELD, P.W.; DUNCAN, M.; SMITH, D.J. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. **J Clin Microbiol**, 39:2313-2316, 2001.

MEGNEGNEAU, P.; DEBETS, F.; HOCKSTRA, R. F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black Aspergilli based on random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, Berlin, v.23, p.323-329, 1993.

NAPIMOGA, M. H.; KAMIYA, R. U.; ROSA, R. T.; ROSA, A.R.; HÖFLING, J. F.; MATTOS-GRANER, R. O.; GONÇALVES, R. B. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals **Journal of Medical Microbiology**, 53: 697–703, 2004.

NAPIMOGA, M. H.; HÖFLING, J. F.; KLEIN, M.I.; KAMIYA, R. U.; GONÇALVES, R. B. Transmission diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. **Jornal Oral Science**, 47. 2: 59-64, 2005.

NASPTIZ, G.M.C.C.; NAGAO, A.T.; MAYER, M.P.A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Anti-*Streptococcus mutans* antibodies in saliva of children with different values of dental caries index. **Pediatr Allergy Immun**, p.143, 1999.

NEWBRUN, E. **Cariologia**. 2. ed. S. Paulo: Santos, 1988. 326 p.

NIE, M.; FAN, F.; BIAN, Z. Transmission of Mutans Streptococci in Adults within a Chinese Population. **Caries Research**, 36:161-166, 2002.

OHO, T. et al. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. **Oral Microbiol Immunol**, 15(4): 258-62, Aug 2000.

OKADA, M. et al. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. **J. Med. Microbiol.**, 51: 443 – 447, May 2002.

PACKER, B.N. et al. Avaliação de fatores relacionados à transmissão de infecção pelos estreptococos do grupo mutans. **Rev ABO Nacional**, vol7,2, 1999.

PEREIRA, M. S.; LEAL, N. C.; SOBREIRA, M.; ALMEIDA, A. M. P.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; TAKAK, G.M. Typing human bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, 35:32-36, 2002.

PETTI, S.; HAUSEN. H.W. Caries Prediction by Multiple Salivary Mutans Streptococcal Counts in Caries-Free Children with Different Levels of Fluoride Exposure, Oral Hygiene and Sucrose Intake. **Caries Research**, 34:380-387, 2000.

PIMENTA,F.C.; MARIN, J. M.; UZEDA, M.; ITO, I. Y.; Prevalence of mutans streptococci in 93 members from six brazilian families. **Pesquisa Odontológica Brasileira**.15(3), 181-186, 2001.

REDMO, E.; LI, I. R.; BRATTHALL, D.. Genotyping shows different strains of mutans streptococci between father and child and within parental pairs in Swedish families. **Oral Microbiol. Immunol**. 13:271-277, oct.,1998.

REDMO, E.; THORNQVIST,E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. **Caries Research**, 34(2).133-139, 2000.

REDMO-EMANUELSSON, I. M.; CARLSSON, P.; HAMBERG, K.; BRATTHALL, D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Oral Microbiol Immunol**, 18:24-29, 2003.

REDMO-EMANUELSSON, L.M.; HAMBERG,K. Heredity and mutans streptococci – a twin study. **Hawaii Convention Center Exhibit Hall** 1-2. March 2004.

ROLF, F.J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, Exeter Publishing, 1988.

RUSSEL, M. W.; HAJISHENGALLIS, G.; CHILDERS, N.K.; MICHALEK, S.M. Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. **Caries Res**, v.33, n.1, p.4-15, Jan/Feb.1999.

SAARELA, M.; VON TROIL-LINDÉN, B.; TORKKO, H.; STUCKI, A.M.; ALALUUSUA, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; ASIKAINEN, S. Transmission of oral bacteria species between spouses. **Oral Microbiol Immunol**, 8:349-354, 1993.

SAARELA, M.; HANNULA, J.; MATTO, J.; ASIKAINEN, S.; ALALUUSUA, S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Arch Oral Biol**, 41: 821-826, 1996.

SAIKI, R. K.; SCARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, p.1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2.ed. CSH Press, vol I, II e III, 1989.

SAMUELS, G.; SEIFERT, K. A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v.33, p.37-67, 1995.

SCHNEIDER, S; ROESSLI, D; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2000**: A software for population genetics data analysis. Switzerland: Genetic and Biometry Laboratory/ University of Geneva.

SMITH, D.J.; KING, W.F.; AKITA, H.; TAUBMAN, M.A. Association of salivary immunoglobulin a antibody and initial mutans streptococcal infection. **Oral Microbiol Immunol**, v.13, n.5, p. 278-285, Oct. 1998.

SNEATH, P.H.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1973, 573p

SNEATH, P.H.A.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9.ed. Baltimore: William e Wilkins, 1994. v.1, p.552-629.

SOUZA, M.L.R. Análise de algumas variáveis clínicas em relação aos níveis salivares de *S. mutans*. **Revista de Odontologia da USP**, p 169-173, jul/dez 1992.

SPOLIDORIO, D.M.P; et al. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in brazilian family members. **Braz. J. Microbiol.**, 34:3, p. 213-217, Jul/Set 2003.

SPOLIDORIO, D.M.P; HÖFLING, J.F.; ROSA, E. A. R.; PEREIRA, C.; MOREIRA, D.; GONÇALVES, R. B. Streptococcus Group Mutans Biotypes and Dental Caries in Brazilian Children Having a Socioeconomic Base. **Braz J Oral Sci**. v.3 (8): 390-394, January/March 2004.

STRINGARI, D. **Estudo da variabilidade genética de *Guinardia spp* por meio de marcadores RAPD e seqüências ITS**. Dissertação de mestrado. UFPR, Curitiba, 2004, 94p.

TANZER, J.M. Microbiology of dental caries. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. **Contemporary oral microbiology and immunology**. St. Louis: Mosby Year Book, p.377-424, 1992.

TEDJOSASONGKO, U.; KOZAI, K. Initial acquisition and transmission of mutans streptococci in children at day nursery. **ASDC J Dent Child**, 69: 284 -288, 2002.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 2ª edição. Editora Santos, 1995. 411p.

TRABULSI, L.A. **Microbiologia**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 1989, 398p.

TRUONG, T.L.; MÉNARD, C.; MOUTON, C.; TRAHAN, L. Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. **J. Med. Microbiol**. 49: 63-71, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de bibliotecas. **Normas para apresentação de trabalhos científicos**. Curitiba: Editora UFPR, 2001, 72p.

UZEDA,M. **Microbiologia Oral**. Ed. Medsi, Rio de Janeiro, 104p. 2002

VAN HOUTE, J.; LOPMAN, J.; KENT, R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. **J Dent Res**, 75:1008-1014, 1996.

VAN LOVEREN, C. et al. The role of diet in caries prevention. **International Dental Journal**, 51. 399-406, 2001.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. Piracicaba, SP. 2000.Tese de doutoramento. Universidade de São Paulo, 172p.

WANG, G.; WHITTAM, T. S.; BERG, C. M.; BERG, D. E. RAPD (arbitrary *primer*) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. **Nucleic Acids Research**, Oxford, 21:5930-5933, 1993.

WATSON,J.D.; GILMAN, M.; WITKOSWSKI, J.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. 2.ed. New York: Freeman and Company. 1992.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting using PCR with arbitrary *primers*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p. 7213-7218, 1990.

WHO. **World Health Organization**. Geneva, 1994, 147p.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, 18:6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.218, p.704-740, 1993.

YAP, I. V. e NELSON, R. J. **Winboot**: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. **IRRI discussion paper**, 14, 22p., 1996.

YAZAKI, S.C.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C.; UNTERKIRCHER, C.S. Anti-*Streptococcus mutans* IgA in children with and without dental caries. **Rev Odontol Univ S Paulo**, 13:3, p 211-217, July/Sept. 1999.

YOO,S.Y.; KIM, P. S.; HWANG, H. K.;LIM, S. H.; KIM, K. W.; CHOE, S. J.; MIN, B. M.; KOOK, J. K. Identification of non mutans streptococci organisms in dental plaques recovering on mitis-salivarius bacitracin agar medium. **J. Microbiol.** 43:204-8, 2005.

ZICKERT, I. et al. Effect of caries preventive measure in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral. Biol.**, 27:861-8, 1982.

## **ANEXOS**



## ANEXO I

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Estamos realizando uma pesquisa com famílias cadastradas no Programa Saúde da Família, da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba, o objetivo desta pesquisa é estudar a principal bactéria causadora da cárie, que é o *Streptococcus mutans*, o qual está presente na saliva, principalmente em pessoas de alta atividade de doença cárie. Ao analisarmos esta bactéria na sua família, estaremos verificando se existe similaridade da mesma entre os componentes de sua família.

Não existem riscos ao paciente relacionados a esta pesquisa, que consiste apenas em coleta de saliva. Não será realizado nenhum procedimento clínico nas pessoas de sua família relacionado a esta pesquisa. O dentista responsável pela pesquisa, Mônica Moreira poderá ser encontrada nos telefones 0xx41 3373-6789, 3285-2099. Caso seja mais conveniente a Professora Vânia Aparecida Vicente está autorizada, como pesquisadora, a prestar os esclarecimentos e pode ser encontrado no Curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná no Departamento de Patologia Básica, todos os dias das 13:30 às 17:30 no telefone 3361-1697/1991. Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante e depois do estudo.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de não autorizar sua participação no estudo, ou se aceitar, retirar seu consentimento a qualquer momento. O tratamento executado na Unidade de Saúde Augusta – SMS – PMC não está condicionado a sua participação.

Os resultados serão divulgados em relatório, eventos e/ou publicações científicas, sendo isto feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

Nenhuma despesa necessária para a realização da pesquisa será de sua responsabilidade.

Pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado(a) a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper a participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão.

Com o consentimento de minha família e dos menores

\_\_\_\_\_  
Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

X \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

\_\_\_\_\_  
Mônica Moreira Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**ANEXO II A**  
**UNIDADE DE SAÚDE AUGUSTA**

Ficha de acompanhamento domiciliar da Equipe Multidisciplinar

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Nome do informante: \_\_\_\_\_  
 Ficha familiar: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Local de residência anterior: \_\_\_\_\_ anos \_\_\_\_\_  
  
 Número de pessoas residentes no domicílio: \_\_\_\_\_  
 Número de cômodos da casa: \_\_\_\_\_  
 Abastecimento de água: ( ) sim regular ( ) sim irregular ( ) não  
 Luz elétrica: ( ) sim regular ( ) sim irregular ( ) não  
 Saneamento básico: ( ) sim fossa séptica ( ) não valeta  
  
 Renda familiar: reais: \_\_\_\_\_ ( ) salários mínimos ( ) *per capita*  
 Ocupação da mãe: \_\_\_\_\_ informal ( ) sim ( ) não  
 Ocupação do pai: \_\_\_\_\_ informal ( ) sim ( ) não  
 Ocupação outra pessoa: \_\_\_\_\_ informal ( ) sim ( ) não  
 Escolaridade do pai: \_\_\_\_\_  
 Escolaridade da mãe: \_\_\_\_\_  
  
 Presença de escova e pasta dental no domicílio: \_\_\_\_\_  
 Queixa odontológica: \_\_\_\_\_

**GENOGRAMA ODONTOLÓGICO**

**OBSERVAÇÕES NO VERSO**

**Hábitos dietéticos familiares:**

Quem mais come doces

Quem menos come doces

**Hábitos de higiene bucal da família:**

Quem mais escova

Quem menos escova

**Doença infectocontagiosa na infância, uso de antibiótico na família:**

	<u>CPOD/ceo</u>	<u>placa</u>	<u>cárie ativa</u>	<u>aleitamento</u>	<u>nº colônias</u>
--	-----------------	--------------	--------------------	--------------------	--------------------

**Mãe**

**Pai**

**Filho 1**

**Filho 2**

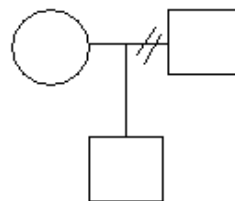
**Filho 3**

**Filho 4**

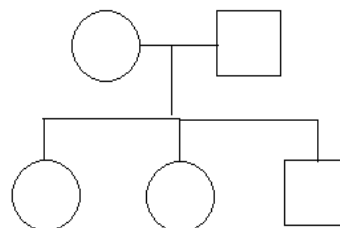
**Filho 5**

## ANEXO II B

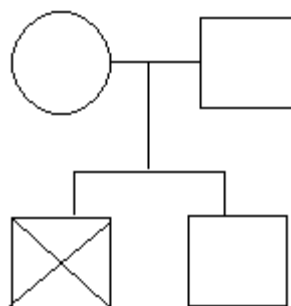
### SITUAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA DAS FAMÍLIAS



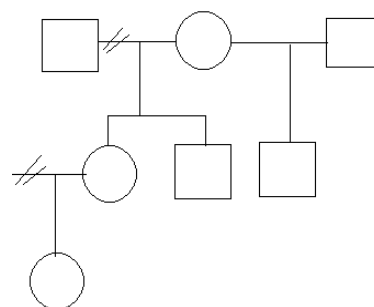
**Família 1:** Composta por mãe e filho, os quais são catadores de papel, com renda mensal familiar de R\$ 200,00. A escolaridade da mãe é primeira série do ensino fundamental, e o filho parou de estudar há três anos. Ambos apresentam situação de saúde bucal precária, ela não possui dentes naturais na boca e ele apresenta alta atividade de cárie, com CPO-D 9 aos 13 anos. O consumo de sacarose é elevado e os hábitos de higiene oral não são valorizados.



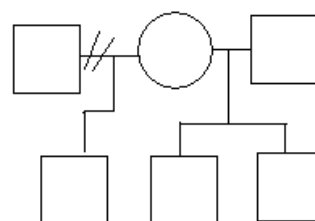
**Família 2:** Neste domicílio vivem mãe, pai e três filhos. Todas as crianças freqüentam a escola, e os pais estudaram até o 4º ano do ensino fundamental. A mãe não trabalha fora e o pai é pedreiro, sendo a renda familiar de R\$ 200,00 mensais. Mãe e filho mais novo apresentam atividade de cárie, esta com história de cárie em todos os dentes, com CPO-D 32.



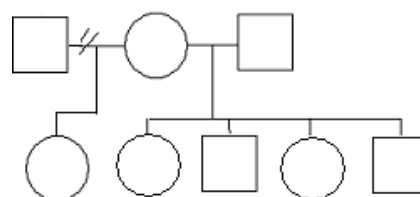
**Família 3:** Composta por mãe, pai e filho. Há três anos o filho mais velho do casal faleceu devido à doença crônico-degenerativa. A residência possui três cômodos, e foi construída pelo esposo que é pedreiro e estudou até a 4ª série do ensino fundamental. A mãe não trabalha fora, tendo estudado até o segundo ano do ensino fundamental. A renda familiar mensal é de R\$ 300,00 mensais. A mãe é a única na família que possui atividade de cárie, com CPO-D 19, e quem menos cuida da saúde bucal.



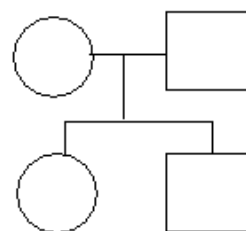
**Família 4:** Composta por mãe, pai, três filhos e a neta (filha da primogênita). A renda mensal familiar de R\$ 180,00 provém do trabalho dos pais, sendo ele carrinheiro e catador de papel, e ela diarista. A mãe estudou até a 4ª série do ensino fundamental e o pai até a 8ª. Apenas o filho mais novo freqüenta a escola. O pai é alcoolista, possui atividade de cárie e CPO-D 6. A mãe não possui dentes na boca. O maior consumo de sacarose na dieta familiar é relatado pelos integrantes mais novos, filho e neta. No momento da coleta de amostras salivares não havia escova dental no domicílio.



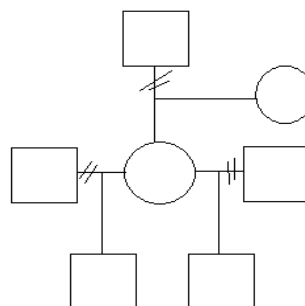
**Família 5:** Formada por pai, mãe e três filhos, sendo que apenas o mais velho freqüenta a escola. A mãe não trabalha fora e o pai é cobrador de ônibus. A renda familiar é de R\$ 400,00 mensais. Ambos os pais têm de escolaridade o primeiro ano do ensino médio. Na família, apenas o filho mais velho tem atividade de cárie, com CEO-D 5 aos 7 anos; e é também o que mais ingere sacarose na dieta familiar e quem menos cuida da saúde bucal.



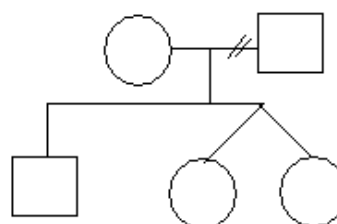
**Família 6:** Neste domicílio moram mãe, pai e cinco filhos, sendo que a mais velha é filha de um relacionamento anterior da mãe. A renda mensal da família é de R\$ 200,00; com o pai possuindo a profissão de mecânico e a mãe de catadora de papéis. Ambos estudaram até a 3ª série do ensino fundamental. As crianças mais velhas estão na escola e os mais novos ficam em casa. O terceiro e quarto filhos apresentam atividade de cárie, sendo que aquele é o que mais come doces e este é o que menos cuida da saúde bucal.



**Família 7:** Nesta família a renda mensal é de R\$ 260,00, para o sustento de mãe, pai e dois filhos. A mãe não trabalha fora e estudou até a 4ª série do ensino fundamental. O pai é zelador e tem apenas um ano de estudo formal. As crianças não estão na escola, pois moravam em outro município da Região Metropolitana de Curitiba e não fizeram a transferência. Mãe e filho mais novo apresentam atividade de cárie, sendo ele o que menos cuida da saúde bucal. Ambos pais possuem história de cárie dental acentuada, sendo que o CPO-D do pai é 26 e da mãe 24. Já o filho mais novo possui CPO-D 1 e ceo-d 7 aos 10 anos.



**Família 8:** Composta por mãe e três filhos, sendo todos de diferentes pais. A renda familiar mensal é de R\$ 230,00, proveniente da mãe que é costureira e que estudou até a 7ª série do ensino fundamental. Mãe e filho mais novo possuem atividade de cárie, sendo que ela apresenta CPO-D 28 e ele CEO-D 14 aos 4 anos. O filho mais novo também é o que mais ingere sacarose na dieta familiar e o que menos cuida da saúde bucal.



**Família 9:** Formada por mãe e três filhos. O mais velho tem problema auditivo e não frequenta a escola, as mais novas são gêmeas e estão na creche do município. A profissão da mãe é costureira, com renda familiar mensal de R\$ 640,00. Apenas uma das gêmeas apresenta atividade de cárie, sendo também a que mais ingere dieta rica em sacarose.

## ANEXO III

TABELA 1 – MATRIZ DAS CORRELAÇÕES

Variáveis*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	1.00																						
2	<b>0.62</b>	1.00																					
3	<b>0.54</b>	-0.23	1.00																				
4	<b>-0.93</b>	<b>-0.70</b>	<b>-0.54</b>	1.00																			
5	0.14	0.18	0.00	-0.15	1.00																		
6	0.03	-0.07	0.09	0.00	<b>-0.82</b>	1.00																	
7	-0.28	-0.18	-0.14	0.26	<b>-0.33</b>	-0.27	1.00																
8	-0.19	-0.18	-0.14	0.26	0.17	-0.10	-0.11	1.00															
9	<b>0.64</b>	<b>0.62</b>	0.13	<b>-0.62</b>	0.16	-0.05	-0.18	-0.13	1.00														
10	-0.27	-0.17	-0.24	<b>0.33</b>	-0.12	0.00	0.19	0.19	-0.20	1.00													
11	-0.17	-0.13	-0.10	0.18	0.20	-0.12	-0.13	0.03	0.08	<b>-0.52</b>	1.00												
12	<b>0.46</b>	0.24	<b>0.40</b>	<b>-0.51</b>	-0.12	0.12	0.00	-0.19	0.02	-0.33	<b>-0.52</b>	1.00											
13	<b>0.40</b>	0.24	0.24	<b>-0.39</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.24	0.07	-0.17	0.07	1.00										
14	-0.01	0.06	-0.14	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.19	0.00	-0.10	0.12	<b>-0.58</b>	1.00									
15	<b>-0.38</b>	<b>-0.31</b>	-0.08	<b>0.33</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.02	-0.07	0.29	-0.20	<b>-0.33</b>	<b>-0.58</b>	1.00								
16	-0.06	-0.02	-0.07	0.07	-0.24	0.26	-0.02	0.15	0.06	0.12	-0.14	0.16	-0.11	0.01	0.10	1.00							
17	0.14	-0.03	<b>0.34</b>	-0.23	-0.18	0.16	0.04	-0.20	0.01	-0.10	-0.01	0.14	0.26	-0.14	-0.10	-0.19	1.00						
18	-0.16	0.11	<b>-0.33</b>	0.15	0.14	-0.06	-0.14	0.21	-0.02	0.00	0.11	-0.20	0.12	-0.11	0.00	-0.22	0.07	1.00					
19	-0.02	0.00	0.07	-0.05	0.12	-0.13	0.01	0.15	-0.14	-0.02	-0.25	<b>0.35</b>	-0.21	0.20	-0.02	-0.12	0.04	0.10	1.00				
20	0.03	0.04	-0.09	0.03	-0.06	0.03	0.06	0.03	0.14	0.13	-0.07	0.07	-0.16	0.03	0.13	<b>0.68</b>	<b>-0.62</b>	<b>-0.55</b>	-0.29	1.00			
21	-0.15	0.02	-0.22	0.14	-0.05	0.02	0.05	0.05	0.21	-0.15	<b>0.34</b>	-0.15	<b>-0.38</b>	-0.15	<b>0.55</b>	0.06	-0.12	-0.01	0.10	0.09	1.00		
22	0.70	<b>0.53</b>	<b>0.49</b>	<b>-0.82</b>	0.07	0.05	-0.21	-0.21	0.32	-0.22	-0.20	<b>0.49</b>	<b>0.39</b>	-0.04	<b>-0.34</b>	-0.07	0.14	-0.32	0.10	0.03	-0.07	1.00	
23	0.10	0.15	-0.02	-0.12	0.04	-0.03	-0.02	0.26	0.17	0.07	-0.13	0.05	0.10	-0.16	0.08	0.01	-0.20	0.00	0.00	0.12	-0.04	0.07	1.00

\* - 1: idade; 2: mãe; 3: pai; 4: filho; 5: 1 isolado de *S.mutans*; 6: 2 isolados de *S.mutans*; 7: 3 isolados de *S.mutans*; 8: isolado de *S.sobrinus*; 9: número de dentes atingidos (CPO-D mais ceo-d); 10: ausência de placa bacteriana dental visível; 11: presença de placa; 12: presença de tártaro; 13: baixo consumo de sacarose; 14: consumo moderado de sacarose; 15: alto consumo de sacarose; 16: contagem de UFC/mL de saliva; 17: morfologia de colônia pequena; 18: morfologia de colônia média; 19: morfologia de colônia grande; 20: morfologia de colônia puntiforme; 21: presença de cárie ativa; 22: anos de estudo formal dos pais; 23: renda *per capita*.

Observação: valores destacados em negritos apresentaram-se significativos à 5% de probabilidade.

### ANEXO III

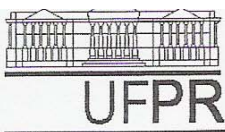
TABELA 2 -PRIMEIRA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E COMUNALIDADE DAS VARIÁVEIS

Componente	Autovalor	Porcentagem da variância	Porcentagem acumulada	Variável	Comunalidade
1	<b>4.8601</b>	<b>21.13</b>	<b>21.13</b>	idade	0.8849
2	<b>2.6033</b>	<b>11.32</b>	<b>32.45</b>	mãe	0.9290
3	<b>2.4625</b>	<b>10.71</b>	<b>43.16</b>	pai	0.8701
4	<b>2.1171</b>	<b>9.20</b>	<b>52.36</b>	filho	0.9614
5	<b>1.8971</b>	<b>8.25</b>	<b>60.61</b>	1 isolado de <i>S. mutans</i>	0.9069
6	<b>1.5361</b>	<b>6.68</b>	<b>67.29</b>	2 isolados de <i>S. mutans</i>	0.9552
7	<b>1.4512</b>	<b>6.31</b>	<b>73.60</b>	3 isolados de <i>S. mutans</i>	0.7665
8	<b>1.3072</b>	<b>5.68</b>	<b>79.28</b>	1 isolado de <i>S. sobrinus</i>	<b>0.6399</b>
9	0.8837	3.84	83.12	nº dentes atingidos	0.7395
10	0.8267	3.59	86.72	sem placa visível	<b>0.6505</b>
11	0.7840	3.41	90.13	com placa visível	0.8270
12	0.6239	2.71	92.84	presença de tártaro	0.7741
13	0.5002	2.17	95.01	baixo consumo sacarose	0.8457
14	0.3751	1.63	96.64	moderado c. de sacarose	0.9177
15	0.2962	1.29	97.93	alto consumo de sacarose	0.8745
16	0.2286	0.99	98.93	ufc/mL de saliva	<b>0.6224</b>
17	0.1250	0.54	99.47	morfologia pequena	<b>0.6567</b>
18	0.0698	0.30	99.77	morfologia média	0.7457
19	0.0390	0.17	99.94	morfologia grande	0.7874
20	0.0132	0.06	100.00	morfologia puntiforme	0.9557
21	0.0000	0.00	100.00	presença de cárie ativa	0.7570
22	0.0000	0.00	100.00	anos de estudo dos pais	0.7340
23	0.0000	0.00	100.00	renda <i>per-capta</i> mensal	<b>0.4330</b>



**ANEXO IV**

**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Curitiba, 25 de agosto de 2.004.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Mônica Moreira**  
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE STREPTOCOCCUS MUTANS EM FAMILIARES DE RISCO SOCIAL E A DOENÇA CÁRIE, ASSISTIDAS PELO PROGRAMA DE SAÚDE DA FAMÍLIA DE CURITIBA- PR-BR.**" está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR em reunião do dia 25 de agosto de 2.004.

Registro **CEP/SD**: 098 SI 061-04-08

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente

*Miguel Ibraim Hanna*  
**Prof. Dr. Miguel Ibraim A. Hanna Sobrinho**  
Coordenador do Comitê de Ética em  
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Endereço: Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-Pr. – C EP: 80060-240  
Fone/fax: 41-360-7259 – e-mail: cometica@saude.ufpr.br

**ANEXO V**

**ARTIGOS A SEREM SUBMETIDOS À PERIÓDICO**